

Zur Chemie und Analytik von Pfefferinhaltsstoffen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München



vorgelegt

von

Ingrid Borup-Grochtmann

aus

Wiesbaden

April 1978



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r
 2. Berichterstatter: Professor Dr. Th. S e v e r i n
- Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1978

Herrn Professor Dr. H. Wagner danke ich sehr herzlich für
die vielfältige Unterstützung und das große Interesse an
dieser Arbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. <u>Allgemeine Übersicht</u>	2
1. Geschichte	2
2. Botanik, Morphologie und Handelsformen des Pfeffers	4
3. Bisherige Kenntnisse über die Inhaltsstoffe von Piper nigrum	5
B. <u>Isolierung</u>	7
1. Dünnschichtchromatographische Voruntersuchungen	7
2. Säulenchromatographie des Pfefferöls	10
2.1. Grobtrennung	10
2.2. Feintrennung	12
2.2.1. Fraktion A	14
2.2.2. Fraktionen B, C und D	14
2.3. Zusammenfassung der Isolierungsergebnisse	15
C. <u>Identifizierung und Strukturaufklärung</u>	16
1. Substanzen 1-4	16
2. Substanzen 13 und 17	22
3. Substanz 5	26
4. Substanz 15	27
5. Piperin, Piperanin, Substanz 11, 12 (und 20)	28
6. Substanz 20	31
7. Substanzen 6, 7 und 8	43
D. <u>Analytische Verfahren zur Identifizierung und Wert-</u> <u>bestimmung von Piper nigrum</u>	56
1. Dünnschichtchromatographische Bestimmung . .	56
2. Gaschromatographische quantitative Bestimmung der Pfefferscharfstoffe	63

	<u>Seite</u>
<u>E. Diskussion</u>	70
1. Lokalanästhetika und Scharfstoffe	70
1.1. Pfefferlokanästhetika	70
1.2. Lokalanästhetische Substanzen anderer Pfefferarten und Pflanzenfamilien . . .	71
1.3. Struktur-Wirkprinzip der Pfefferlokal- anästhetika	76
1.4. Scharfstoffe	78
1.5. Beziehungen zwischen Schärfe und Lokal- anästhesie bei Pfeffersubstanzen	82
2. Pharmakologie und biologische Wirkungen der Pfefferinhaltsstoffe	84
Z U S A M M E N F A S S U N G	86
E X P E R I M E N T E L L E R T E I L	88
1. Herkunft der Droge	88
2. Allgemeine Arbeitsmethoden	88
2.1. Herstellung des Pfefferextrakts	88
2.2. Dünnschichtchromatographisches Screening Verfahren	88
2.3. Präparative Dickschichtchromatographie für die orientierende Geschmacksprüfung	89
2.4. Säulenchromatographische Isolierung	89
2.4.1. Herstellung und Vorbereitung der Säulen	89
2.4.2. Isolierung der Substanzen	90
3. Physikalisch-chemische Untersuchungen	95
3.1. Schmelzpunkte	95
3.2. UV-Spektren	95
3.3. IR-Spektren	95
3.4. H-NMR-Spektren	95
3.5. Massenspektren	95
3.6. Optische Drehung	95

	<u>Seite</u>
4. Strukturaufklärungen	96
4.1. Substanzen 1 - 4	96
4.2. Substanzen 13 und 17	
4.3. Substanz 5	97
4.4. Substanz 15	98
4.5. Scharfstoffe (außer Substanz 20)	99
4.6. Substanz 20	100
4.7. Substanz 6	101
4.8. Substanz 8	102
4.9. Substanz 7	102
5. Analytische Verfahren zur Identifizierung und Wertbestimmung von Piper nigrum	103
5.1. Qualitative Dünnschichtchromatographie von Piper nigrum und Piper album	103
5.2. Gaschromatographische Gehaltsbestimmung des Piperins in Piper nigrum und Piper album .	104
UV-, IR-, H-NMR- und ¹³ C-Tabellen	106
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	114

E I N L E I T U N G

Die Früchte von *Piper nigrum* waren wegen ihres charakteristischen Aromas und scharfen Geschmacks seit alten Zeiten als Gewürz begehrt. Außer als Würzzusatz hat der Pfeffer in der Lebensmittelindustrie wegen seiner antibiotischen Eigenschaften auch als Konservierungsmittel Bedeutung erlangt (1).

Pharmazeutisch gesehen, gehört der Pfeffer zur Gruppe der Scharfstoffdrogen. Er findet hier vor allem als appetitanregendes und verdauungsförderndes Mittel Verwendung. In der Volksheilkunde wurde er zusätzlich gegen Krätze, in Gurgelwässern, bei Haemorrhoidalleiden, Neuralgien sowie als Hautreizmittel, Expektorans, Augenmittel und als Durchblutung förderndes Mittel verwendet. Lange Zeit war Pfeffer auch als Fiebermittel, sogar bei Wechselfieber anstelle von Chinin in Gebrauch. Dem Pfeffer wird außerdem eine insektizide und taenizide Wirkung nachgesagt (2-5).

Da die sensorische Bestimmung von Scharfstoffen heute den modernen Anforderungen der Analytik nicht mehr genügt, sollte wie bei den Enzianbitterstoffen (6) versucht werden, für diese eine chemische oder andere geschmacksunabhängige Bestimmungsmethode auszuarbeiten.

Hierzu waren die genaue Kenntnis aller am Geschmack beteiligten Verbindungen des Pfeffers Voraussetzung. Obwohl schon eine Reihe von Verbindungen aus dem Pfeffer bekannt sind, hat eine orientierende Untersuchung gezeigt, daß die Droge noch eine Vielzahl anderer Verbindungen enthält. Ihre Isolierung und Strukturaufklärung war das Ziel dieser Arbeit.

Möglicherweise liefern diese auch einen Beitrag zur wissenschaftlichen Erklärung einiger zweifelhafter und nicht belegter Anwendungen des Pfeffers.

ALLGEMEINER TEIL

A. Allgemeine Übersicht

1. Geschichte (7-10)

Die Heimat des Pfeffers ist Vorderindien. Pfeffer leitet sich vom Sanskritwort "pippali" her. Er wird bereits in alten epischen Dichtungen der Inder erwähnt.

Bereits in vorchristlicher Zeit kam der Pfeffer über Persien und Arabien nach Europa. Zu Homers Zeiten (9. Jahrh. v.Chr.) scheint er im Abendland noch nicht bekannt gewesen zu sein. Die ersten Aufzeichnungen gehen auf den griechischen Arzt Hippocrates (460-377 v.Chr.) zurück. Allgemeine Kenntnis vom Pfeffer erhielten die Griechen erst durch den großen Indienfeldzug Alexanders des Großen (etwa 327 v.Chr.). Eine genauere Kunde stammt von dem griechischen Philosophen und Begründer der Botanik Theoprast (372-287 v.Chr.). Er unterschied bereits schwarzen und langen Pfeffer. Der griechische Arzt Dioskurides nennt in seiner Arzneimittellehre auch den weißen Pfeffer.

Die Römer lernten den Pfeffer von den Griechen kennen (Plinius 23-79 n.Chr.). Von Alexandrien aus entwickelte sich ein reger Handelsverkehr nach Indien. Im ersten Jahrhundert unserer Zeitrechnung wurden in Rom große Lagerhäuser für Pfeffer errichtet. Pfeffer galt damals als Kostbarkeit und wurde wie Gold und Silber gehandelt. Die vornehmen Griechen und Römer verwendeten ihn als Medizin und zum Würzen ihrer Speisen. Diese Sitte wurde bei den Germanen erst zu Zeiten Alarichs des Ostgotenkönigs bekannt. Zur Aufhebung der Belagerung Roms (408 n.Chr.) erhielt er als Lösegeld unter anderem 3.000 Pfund Pfeffer.

Der erste Abendländer, der die "Pfefferrebe" in ihrer Heimat an der Malabarküste gesehen (etwa um 540 n.Chr.) und aufs genaueste beschrieben hat, war der griechische Kaufmann Kosmas,

der später den Beinamen Indikopleustes, der Indienfahrer, erhielt. Später im 13. Jahrhundert berichtet der Venezianer Marco Polo als erster Europäer eingehend über die Pfefferpflanze.

Pfeffer galt bis ins hohe Mittelalter allgemein als Zahlungsmittel, mit dem Steuern, Tribute, Zölle und Abgaben für Leibeigene beglichen wurden. Eine entsprechend große Rolle spielte der Pfefferhandel. Die reichen Gewürzhändler nannte man spöttisch "Pfeffersäcke". Venedig war der wichtigste Handelsplatz für Pfeffer. In Indien galten Calicut und Cochin an der Malabarküste als bedeutende Ausfuhrhäfen. Die größte Menge an Pfeffer wurde zu dieser Zeit nach China exportiert.

Nach der Entdeckung des Seeweges um Afrika durch Vasco da Gama (1498) ging das Gewürzmonopol auf die Portugiesen über und der venezianisch-arabische Zwischenhandel verlor an Bedeutung. Um 1600 verdrängten die Holländer die Portugiesen aus dem lukrativen Gewürzgeschäft, das dann gegen Ende des 18. Jahrhunderts die Engländer für sich beanspruchten.

Infolge der immer größeren Nachfrage dehnte sich der Pfefferanbau im 19. Jahrhundert allmählich über das ganze tropische Ostasien aus, insbesondere nach Sumatra, Borneo und Straits. Durch die Jesuiten wurde der Pfeffer nach Brasilien gebracht.

Heute wird der Pfeffer im ganzen indisch-malaiischen Gebiet und im tropischen Brasilien angebaut.

Schwarzer Pfeffer stammt besonders von der Malabarküste Indiens, aus Singapur und Sarawak (Nordborneo); weißer Pfeffer kommt aus Singapur (von den Riau Inseln), Java, Thailand (Inseln Penang = Inseln Straits) und Sarawak. Pfefferanbau gibt es ferner auf Sri Lanka (= Ceylon), den Philippinen, auf Madagaskar, in Westafrika von Sierra Leone bis Kongo, auf den Antillen und in Brasilien.

2. Botanik, Morphologie und Handelsformen des Pfeffers (3,7, 11-14)

Piper nigrum ist eine ausgesprochene Tropenpflanze und gehört zur Familie der Piperaceen. Als mehrjährige Liane, bzw. Kletterstrauch, vermag sie sich mit ihren Luftwurzeln bis zu 15 m an Bäumen und Stangen emporzuranken. Die Früchte sind locker hängende Ähren. Die perianthlosen, unscheinbaren Blüten sind ungestielt und sitzen in den Achseln der Tragblätter. Die reife, beerenartige Frucht ist rot. Sie ist eine Steinfrucht und besteht aus Fruchtwand, Samenschale und stärkereichem Perisperm.

Gehandelt wird der Pfeffer als *Piper nigrum*, schwarzer Pfeffer, als *Piper album*, weißer Pfeffer und als grüner Pfeffer. Die besten Handelssorten sind der Malabar- und Mangalore-, Terricherry- und Aleppy-Pfeffer.

Zur Gewinnung von schwarzem Pfeffer werden die ausgewachsenen unreifen Früchte gesammelt, sobald die ersten Früchte einer Ähre einen rötlichen Schimmer bekommen, und dann auf Matten in der Sonne getrocknet. Dadurch erhalten die Früchte ein schwarzes runzliges Aussehen. Je weiter die ausgewachsenen Früchte von der völligen Reife entfernt sind, desto schwerer sind die getrockneten Beeren und desto härter und schmackhafter sind sie. Entsprechend unterscheidet man drei Handelsklassen: den harten, schweren Pfeffer, den halbharten und den leichten Pfeffer.

Zur Gewinnung des weißen Pfeffers werden die vollreifen roten Früchte geerntet. Zu Haufen geschichtet läßt man sie einige Tage fermentieren. In Körben oder Säcken werden die fermentierten Früchte einige Zeit in fließendes Wasser gestellt, so daß die Schalen erweichen und leicht abgerieben werden können. Die von den Schalen befreiten Früchte werden in der Sonne getrocknet. Sie haben eine weißgraue, glatte Oberfläche.

Der grüne Pfeffer stellt ein Handelsprodukt dar, bei dem die ganzen Ähren samt den noch unreifen grünen Pfefferfrüchten geerntet und in Salzwasser eingelegt werden.

Im Pfeffer sind die für das Aroma wichtigen Substanzen in Harz- und Ölzellen als Sekundärstoffe enthalten. Diese Exkretzellen liegen im Mesocarp sowie verstreut im stärkehaltigen Perisperm des Samens. Letztere enthalten die charakteristischen Scharfstoffe des Pfeffers.

3. Bisherige Kenntnisse über die Inhaltsstoffe von Piper nigrum

Die am eingehendsten untersuchten Stoffklassen des Pfeffers sind sein ätherisches Öl (15-25) und die Scharfstoffe. Aus dem ätherischen Öl ließen sich Substanzen verschiedenster Verbindungsklassen identifizieren; und zwar Vertreter der Mono-terpenkohlenwasserstoffe (α -Pinen, β -Pinen, Camphen, Phellandren, Myrcen, Terpinen, Limonen, p-Cymol), der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe (Copaen, β -Caryophyllen, Bisabololen, Selinen) sowie sauerstoffhaltige Verbindungen wie Epoxiäther (1.8-Cineol, α -Pinenoxid, Limonenoxid), Alkohole (Linalool, Carvacrol, Borneol, α -Terpineol, Nerol, Myrtenol, β -Caryophyllen-Alkohol), Carbonylverbindungen (β -Pinon, Dihydrocarvon, Myrtenol, N-Formyl-piperidin, Piperonal) und freie Säuren sowie deren Methylester^x (Buttersäure, Isovaleriansäure^x, Benzoesäure^x, Phenyllessigsäure^x, Zimtsäure, Piperonylsäure^x).

Eine Reihe der genannten Verbindungen können als biogenetische Vorstufen der Scharfstoffe angesehen werden. Die im Pfefferöl enthaltenen Pfefferscharfstoffe selbst sind Säureamide, die durch einen Piperidin- bzw. Pyrrolidinrest gekennzeichnet sind. Es sind dies die Verbindungen Piperin, Piperanin, Piperettin und Piperylin (26-29).

Grewe und Mitarbeiter (29) konnten als strukturell verwandte Piperidinsäureamide die Piperoleine A und B isolieren, die

ihren Ausführungen zufolge nicht scharf schmecken. Als Vertreter der Lignane wurde das Cubebin isoliert.

Lebensmittelchemisch von Bedeutung ist zudem der hohe Lipasegehalt des Pfeffers, dessen Aktivität, die der anderen Gewürze um das 10-fache übersteigt und beim Würzen von Wurst-dauerwaren zu unerwünschtem Fettabbau Anlaß geben kann (30).

Außerdem enthält der Pfeffer noch ein geschmacklich neutrales fettes Öl. Es ist in dem durch Extraktion gewonnenen Pfefferöl zu etwa 10 % enthalten. Seine Fettsäurezusammensetzung ist von Bedi et al. (31) eingehend untersucht worden. Es hat als Suspensions- und Lösungsmittel für Scharfstoffe und andere Inhaltsstoffe Bedeutung, da z.B. kristallines Piperin nicht scharf schmeckt.

B. Isolierung

1. Dünnschichtchromatographische Voruntersuchungen

Ausgangsmaterial für die Isolierung der Pfefferinhaltsstoffe war das "Pfefferöl". Es wurde aus gepulvertem schwarzen Pfeffer durch erschöpfende Soxhletextraktion mit Methylenchlorid gewonnen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels betrug die Ausbeute etwa 10 %. Pfefferöl ist eine viskose Flüssigkeit mit dunkelgrüner Farbe. Es besitzt einen aromatischen, typischen Pfeffergeschmack und schmeckt brennend scharf.

Die Grundlage für den Isolierungsgang sollte ein optimales dünnschichtchromatographisches Auftrennungsverfahren sein. Die der Literatur entnommenen Fließmittel (20 % Aceton in Skellysolve F, Äther/Methylenchlorid 9 : 1, n-Dibutyl-äther/Methanol/Essigsäure 97 : 2 : 1, Äther/Methylenchlorid 4 : 1) (27, 29) erwiesen sich als ungeeignet, da sie lediglich zur Reinigung und Identifizierung einzelner Pfeffersubstanzen verwendet worden waren. Für eine Auftrennung aller Pfefferölbestandteile waren sie nicht effektiv genug. Wir entwickelten darum ein neues ternäres Fließmittelsystem, das folgende Zusammensetzung hatte: Benzol/Diisopropyläther/Dioxan (62,5 : 21,5 : 16).

Das Screening-Verfahren wurde mit Kieselgel-beschichteten Aluminiumfolien durchgeführt. Das Kieselgel war mit einem Leuchtstoff präpariert, so daß es im kurzwelligen UV-Licht fluoreszierte. Wurden nur geringe Substanzmengen aufgetragen, so war die Trennung so scharf, daß schon 9 cm Laufstrecke genügten, um mindestens 10 Einzelzonen zu erhalten. Die Substanzen ließen sich aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz oder durch Fluoreszenzminderung im lang- oder kurzwelligen UV-Licht nachweisen. Einzelne Zonen zeigten nach Besprühen mit konzentrierter Schwefelsäure charakteristische Farbdifferenzierungen. Damit die Färbungen deutlich hervortraten, war es vorteilhaft, die Platten noch vor dem völligen Verdunsten des Laufmittels zu besprühen.

Das Pfefferöl läßt im UV₂₅₄ zehn Hauptzonen erkennen. Wir haben sie mit I - X beziffert.

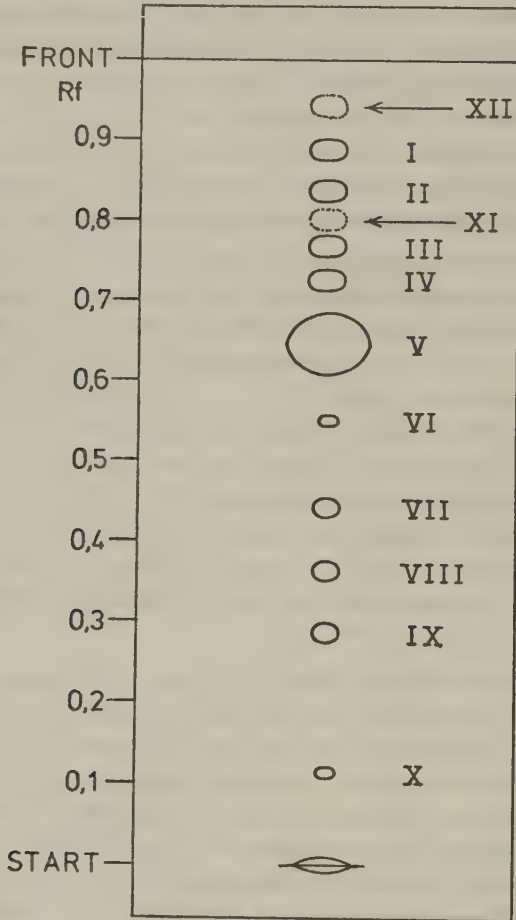


Abb. 1
Dünnschichtchromatographisches Screening

Am stärksten erscheint die Zone V. Sie ist schon unbesprüht im Tageslicht schwach gelblich gefärbt und enthält u.a. Piperin und Piperanin, wie sich durch Vergleich mit vorhandenen Testsubstanzen zeigte. Die Zonen VI und X treten nur schwach hervor. Die mit XI und XII bezeichneten Zonen waren zunächst nicht zu erkennen. Sie traten erst im weiteren Verlauf des Isolierungsganges nach Anreicherung in Erscheinung. Eine orientierende Prüfung auf Geschmacksunterschiede war nach der präparativen Dickschichtchromatographie möglich. Verwendet wurden Kieselgel-Dickschichtplatten mit Fluoreszenzzusatz. Das Fließmittel war das gleiche wie beim Screening-Verfahren. Die Detektion erfolgte wiederum im kurzwelligen UV-Licht. Die Trennung war allerdings wesentlich weniger scharf als auf den Dünnschichtfertigfolien. Nach Elution der einzelnen Zonen waren folgende Geschmacksunterschiede feststellbar:

I	nicht scharf
II	leicht anästhesierend
III	etwas scharf, bitter
IV	etwas scharf, bitter
V	brennend scharf
VI	undefinierbar
VII	} bitterer Geschmack vorherrschend
VIII	
IX	scharf
X	undefinierbar

2. Säulenchromatographie des Pfefferöls

2.1. Grobtrennung

Etwa 200 g Pfefferöl wurden in wenig Methylenchlorid gelöst und über zwei parallel laufende, mit neutralem Aluminiumoxid beschickte Säulen mit Methylenchlorid als Eluans vorge- trennt. Die Säulen wurden mit Wasser gekühlt, da sich ge- zeigt hatte, daß erst unterhalb 15°C befriedigende Trennungen erreichbar waren. Die Eluate wurden mit Hilfe der Dünnschicht- chromatographie nach dem oben beschriebenen Screening-Ver- fahren in vier Hauptfraktionen unterteilt, s.Abb. 2:

Fraktion A - enthielt die Hauptmenge aller Substanzen aus den oberen Zonen des Dünnschicht- chromatogramms, I-V, daneben auch Sub- stanzen aus dem unteren Bereich VI-X.

Fraktion B - enthielt Substanzen aus Zone V und IX.

Fraktion C - enthielt hauptsächlich Zone IX, neben etwas Substanz aus Zone XI und XII.

Fraktion D - bildete den Nachlauf. Es enthielt nur noch etwas Substanz aus Zone IX.

Aus den Säulen wurden zwischen 75 und 80 % der angegebenen Menge eluiert. Der Rest wurde in den Säulen zurückgehalten, darunter auch die Hauptmenge des Chlorophylls. Nur ein Teil davon wanderte mit der Front durch die Säulen, wodurch die Grünfärbung der A-Fraktion verursacht wurde. Die übrigen Fraktionen B, C und D waren gelb gefärbt.

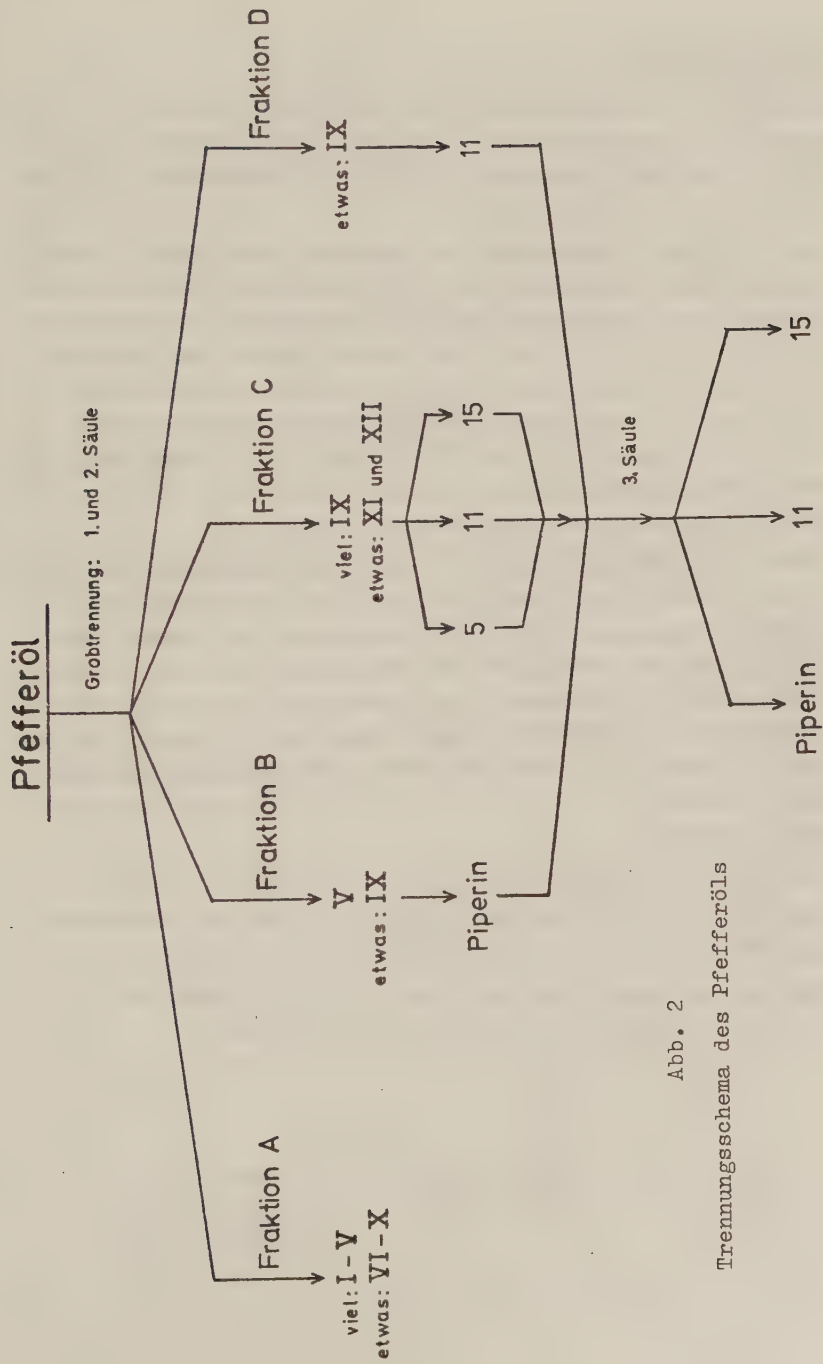


Abb. 2

Trennungsschema des Pfefferöls

2.2. Feintrennung

Die weitere Auftrennung der vier Hauptfraktionen A, B, C und D erfolgte wechselweise an Kieselgel- und Aluminiumoxidsäulen. Verwendung fanden Säulen mit einem Durchmesser zwischen 1,5 und 10 cm und einer Füllhöhe von 20 bis 90 cm.

Als Elutionsmittel wurden zwei Lösungsmittelsysteme wechselnder Zusammensetzung verwendet. Die Zusammensetzung des Fließmittels Benzol/Diisopropyläther/Dioxan wurde von 65-85 % : 10-30 % : 5-15 % variiert. Das andere System, das vorzugsweise zur Reinigung einiger Pfeffersubstanzen diente, enthielt nur die zwei Komponenten Cyclohexan-Äthanol. Die Mischung wechselte von 90-100 % : 10-0 % und wurde teils mit 0,1 % Wasserzusatz angewendet. Sämtliche Säulen wurden, aus bereits erwähnten Gründen, wassergekühlt.

Jeder Säulendurchgang wurde in vier bis fünfzehn Fraktionen untergliedert. Fraktionen aus verschiedenen Säulen, aber gleicher Zusammensetzung wurden vereinigt und erneut säulenchromatographisch getrennt. Das Trennverfahren wurde solange fortgesetzt, bis die einzelnen Substanzen in unterschiedlichen, aber wenigen Fraktionen so angereichert waren, daß sie bei $+ 4^{\circ}$ bzw. $- 10^{\circ}$ ausfielen und durch einfaches Filtrieren - ebenfalls in der Kälte - über Mikrofritten isoliert werden konnten.

Für einen vollständigen Isolierungsgang, der genügend reines Material zur Strukturaufklärung aller einzelnen Substanzen lieferte, wurden etwa 65 Säulentrennungen benötigt.

Die aus den Haupt- und Unterfraktionen isolierten Substanzen haben wir mit arabischen Zahlen gekennzeichnet.

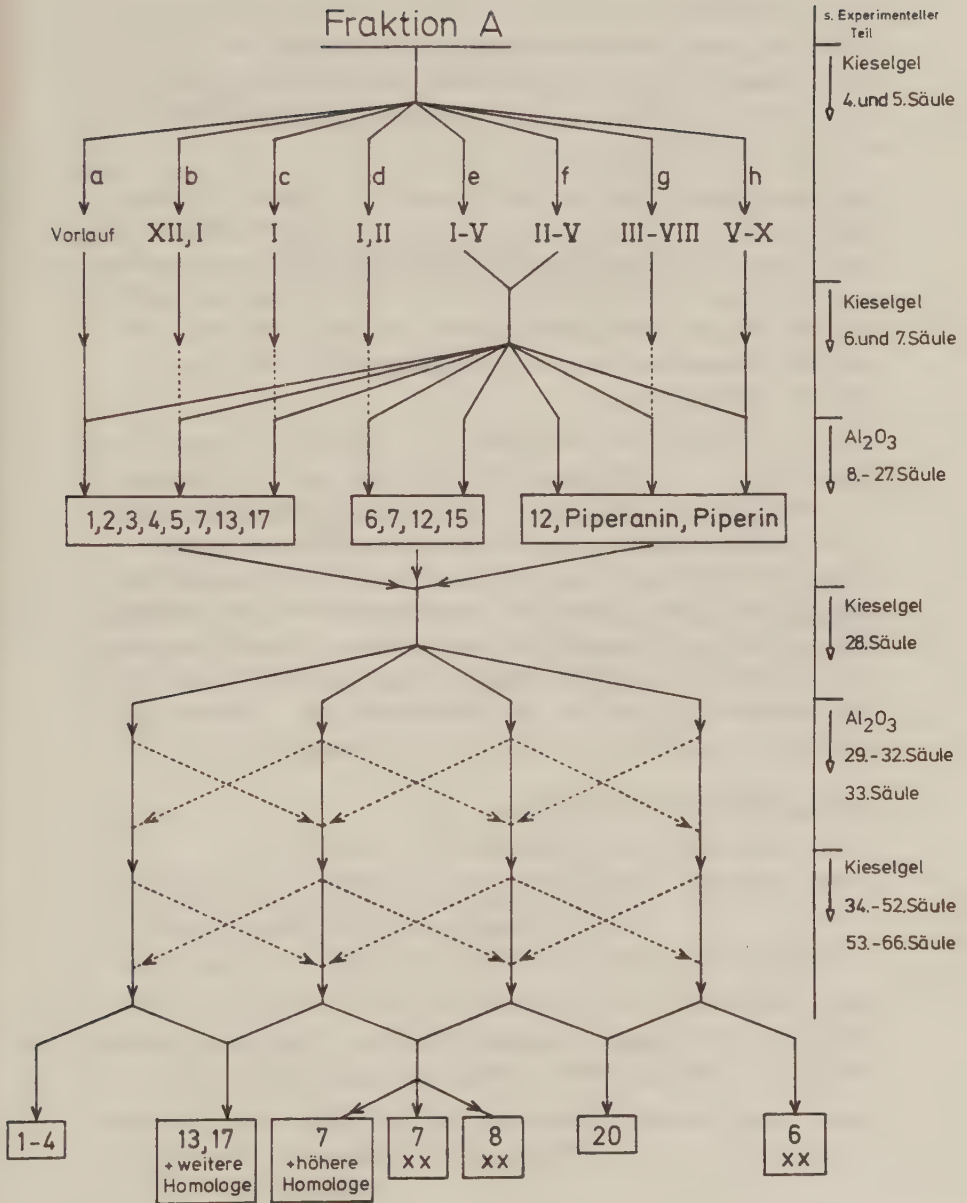


Abb.3 Auftrennungsschema der Fraktion A

2.2.1. Fraktion A

Fraktion A wurde zunächst über eine Kieselgelsäule weiter aufgetrennt, s. Abb. 3. Von den hier anfallenden Fraktionen gaben wir die erstisolierten und die letzten direkt über eine Aluminiumsäule.

Die mittleren Fraktionen wurden zuvor nochmals über eine Kieselgelsäule und die dabei anfallenden Fraktionen gleichfalls über Aluminiumsäulen chromatographiert. Die Mutterlaugen wurden entsprechend vereinigt und erneut an zahlreichen Säulen weiter aufgetrennt. Die sich vielfach ineinander verzahnenden Isolierungsschritte sind grob in Abb. 3 skizziert.

Wie dem Schaubild zu entnehmen ist, fielen oft die gleichen Substanzen an verschiedenen Stellen des Isolierungsganges an. Erst am Ende des Isolierungsprozesses waren die gewonnenen Substanzmengen für die Strukturaufklärung ausreichend. Die mit xx versehenen Substanzen kristallisierten unmittelbar nach Austritt aus den Säulen aus. Die Ausbeuten bei den einzelnen Substanzen lagen zwischen 10-50 mg. Eine Ausnahme machte das Piperin. Es stellte mit über 50 % den dominierenden Anteil des Pfefferöls dar. Substanz 20 konnte in einer Menge von 1,5 g erhalten werden.

2.2.2. Fraktionen B, C und D

Aus Fraktion B fiel zunächst Piperin aus,
aus Fraktion C konnte Substanz der Zone IX (Substanz 11),
sowie Substanz aus Zone XI (Substanz 15)
und XII (Substanz 5) gewonnen werden.

Aus Fraktion D fiel noch etwas Substanz aus Zone IX an.

Nach Abtrennung der genannten Substanzen wurden die vereinigten Mutterlaugen nochmals über eine Aluminiumoxidsäule mit Methylenchlorid als Elutionsmittel aufgetrennt, s. Abb. 2.

Dabei wurde die Hauptmenge aus Zone IX (Substanz 11) sowie Substanz aus Zone XI (Substanz 15) gewonnen.

2.3. Zusammenfassung der Isolierungsergebnisse

Aus den einzelnen, nach der DC aufgeteilten Zonen ließen sich die in der Tabelle 1 zusammengestellten Substanzen bzw. Substanzgemische isolieren:

Tabelle 1:

DC-Zone	Isolierte Substanzen
I	1, 2, 3, 4, 13, 17
II	7
III	6, 20
V	Piperin, Piperanin, 12
IX	11
XI	8, 15
XII	5, 14

Substanzen der Zonen IV, VI-VIII und X wurden nicht weiter untersucht, da sie entweder nur in Spuren anfielen oder nicht weiter auftrennbare Gemische lieferten.

C. Identifizierung und Strukturaufklärung

1. Substanzen 1-4

Die Substanzen 1-4 entstammten den ersten Fraktionen des Isolierungsganges (s. Abb. 3). Im DC liefen sie in die Höhe der Zone I. Sie gaben nur im kurzwelligen UV-Licht eine Fluoreszenzminderung. Mit konz. Schwefelsäure lieferten sie keine Färbung. Ihr Geschmack war neutral. Im Schmelzpunkt unterschieden sie sich wenig voneinander: 1. $87-88^{\circ}$, 2. 89° , 3. $91-92^{\circ}$, 4. $90-91^{\circ}$. Obwohl die Kristallformen z.T. sehr verschieden waren, ließ dies Verhalten vermuten, daß es sich entweder um ein und dieselbe Verbindung oder um Gemische homologer Verbindungen handelte.

Die Massenspektren bestätigten, daß die isolierten Substanzen 1-4 Gemische von jeweils drei gleichen homologen Verbindungen unterschiedlicher Konzentration darstellten. Die Molekülpeaks waren bei $M^{+} 363$, $M^{+} 335$ und $M^{+} 307$, wobei die mittlere Substanz immer vorherrschend war. Aufgrund der Molekulargewichte konnte ausgeschlossen werden, daß es sich um Piperinanalogue (Piperin $M^{+} 285$) handelte. Aus den ungeraden Massenzahlen war aber auf ein Stickstoffatom im Molekül zu schließen. Dieses Ergebnis wurde durch die CNH-Analyse bestätigt.

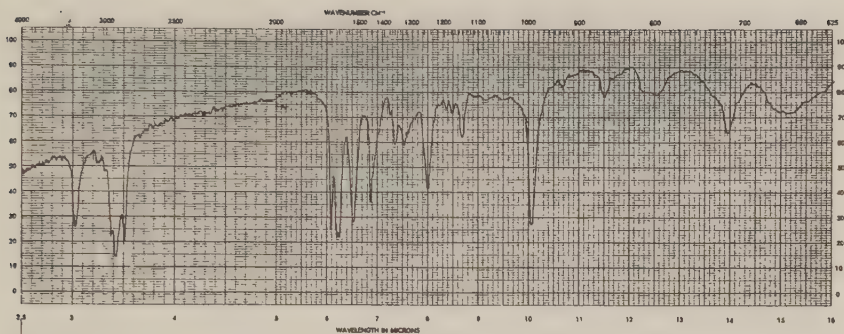


Abb. 4

IR-Spektrum der Substanzen 1-4

Im IR-Spektrum (s.Tab. 15 a/b, S. 107/108) zeigte eine Valenzschwingung bei 3300 cm^{-1} eine NH-Gruppe an. Es mußte einer Bande bei 1650 cm^{-1} zufolge ein sekundäres Amid vorliegen, das offenkettig zu sein schien, da auch bei 1540 cm^{-1} eine Bande auftrat. Von den vorhandenen Banden bei 1620 und 1600 cm^{-1} sollte die kürzerwelligere der Amid-Carbonylgruppe zuzuordnen sein. Ein Aromat war wahrscheinlich nicht vorhanden, da typische Substituentenbanden in den Bereichen $1500\text{--}1400$, $1100\text{--}1000$ und $850\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ fehlten.

Auch das H-NMR-Spektrum (s.Tabelle 16 S.109) sprach gegen das Vorhandensein eines aromatischen Kerns. Im aromatisch-vinylischen Resonanzbereich lagen zwei breite Multipletts: das eine zwischen $\delta = 5.08 - 6.12\text{ ppm}$, das für vier Protonen integrierte, das andere zwischen $\delta = 6.85 - 7.42\text{ ppm}$ entsprechend einem Proton mit $J = 10$ und 15 Hz .

Das UV-Spektrum der Homologengemische lieferte eine starke Absorption bei $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 258 nm, die für Substanzen mit einem konjugierten Dienonsystem wie z.B. das Sorbinsäureamid (32), typisch ist.

Die Doppelbindung mußte, der stark ausgeprägten Bande bei 992 cm^{-1} zufolge, trans-trans-Konfiguration haben.

Aus dem NMR-Spektrum ging außerdem hervor, daß die Substanzen drei Methylgruppen enthielten. Zwei scharfe Signale bei $\delta = 0.8$ und 0.9 ppm integrierten für insgesamt 9 Protonen. Sie stellten ein Dublett mit $J = 6$ Hz für 6 Protonen dar, in dem noch ein Triplet für 3 Protonen enthalten war. Aufspaltung und Kopplungsgröße des Dubletts ließen die Nachbarschaft eines Protons und somit eine Isopropylgruppierung vermuten. Dies war in Übereinstimmung mit der bei 1360 und 1380 cm^{-1} auftretenden, aufgespaltenen CH_3 -Deformationsbande und den weiteren Banden bei 1180 , 1150 , 870 und 800 cm^{-1} .

Weitere Information brachte die MS-Fragmentierung (Abb.5 u.6). Die intensiven Peaks bei m/e 152, 166 und 180 lieferten den Hinweis, daß die isolierten Substanzen eine Isobutyldienamidgruppe enthielten. Diese wird allein oder zusammen mit einer oder zwei Methylengruppen abgespalten. Auch die Peaks bei m/e 113, 96 und 81 ließen sich einem Dienamidssystem zuordnen. Das Auftreten der Massen m/e 43 und 57 sowie die, jeden der drei Molekularpeaks begleitenden $M^+ - 43$ und $M^+ - 72$ Abspaltungen, deuteten ebenfalls auf die Anwesenheit einer Isopropyl-, Isobutyl- bzw. Isobutyldienamidgruppe hin.

Für ein Isobutyldienamidssystem sprach außerdem im NMR-Spektrum ein Triplet bei $\delta = 3.08$ ppm mit $J = 6$ Hz. Da es für zwei Protonen integrierte, sprach es für eine, an den sekundären Stickstoff einer Amidgruppe gebundene Methylengruppe. Die Resonanz des Amidprotons lag im Multiplet der vinyllischen Protonen. Das Wasserstoffatom des tertiären Kohlenstoffs der Isobutylgruppe verbarg sich in einem brei-

ten Multiplett zwischen $\delta = 1.8 - 2.2$ ppm. Dieses integrierte für drei Protonen. Davon entfiel eines auf das erwähnte Wasserstoffatom, während die anderen beiden einer, dem Diensystem unmittelbar benachbarten Methylengruppe angehören mußten.

Aus diesen, aus den Spektren zusammengetragenen Strukturelementen ergab sich folgendes vorläufiges Formelbild (Abb. 5):

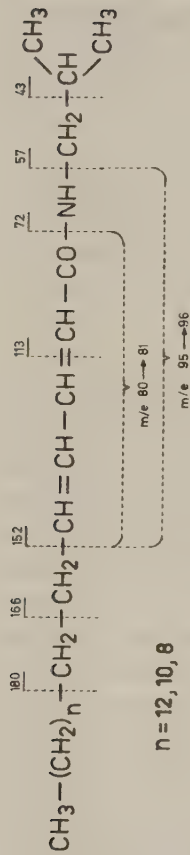


Abb. 5 Zerfallsschema der Substanzen 1-4

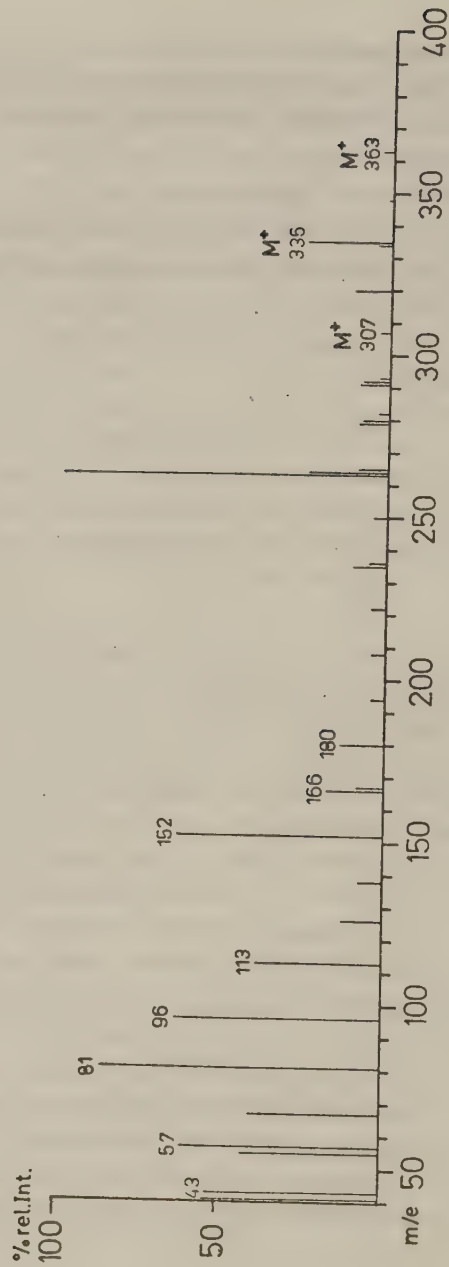


Abb. 6 Massenspektrum der Substanzen 1-4

Danach unterschieden sich die Verbindungen wahrscheinlich nur in der Zahl der Methylengruppen am Methylen-ende. Unbekannt blieb nur noch die Länge der Kohlenstoffkette. Ein breites Singulett im NMR-Spektrum der Substanzgemische bei $\delta = 1.18$ ppm mit einer Intensität von 24 H sprach für 12 CH_2 -Kettenglieder. Aus den Massenspektren errechneten sich $n = 8, 10$ bzw. 12 Methylengruppen für die einzelnen Homologen. Der Paraffincharakter der Homologen fand insbesondere im MS-Spektrum seinen Niederschlag. Der gleichmäßige, stufenweise über 14 Masseneinheiten erfolgende, für eine Paraffinkette typische Abbau der Moleküle führte zu den bereits erwähnten Fragmenten m/e 180, 166 und 152. Die Substanzen 1-4 enthielten somit alle die gleichen drei homologen Verbindungen. Diesen dürften folgende chemische Strukturen zukommen:

N-Isobutyl-eicosa	-trans-2-trans-4-dienamid	(M^+ 363)
"	-octadeca-	(M^+ 335)
"	-hexadeca-	(M^+ 307).

Nach Abschluß unserer Arbeiten erschien eine Veröffentlichung von Raina und Mitarbeitern(33), in der über die Isolierung einer, unserem höchsten Homologen entsprechenden Verbindung aus *Piper nigrum* berichtet wurde. Auch die von Okogun und Mitarbeitern(34) in *Piper guineense* entdeckten Isobutylamide (Schmp. $83 - 86^\circ\text{C}$) könnten mit unseren Substanzen identisch sein.

2. Substanzen 13 und 17

Diese Substanzen wurden aus Mutterlaugen und Nachbarfraktionen der zuvor beschriebenen Homologengemische erhalten. Auf dem DG lagen sie wiederum in Zone I. Sie absorbierten im UV₂₅₄ und hatten eine schwach hellblaue Fluoreszenz bei 366 nm. Nach Besprühen mit konz. Schwefelsäure färbten sie sich gelblich an.

Substanz 13 schmolz unscharf zwischen 73-82° C. Der Geschmack war neutral. Substanz 17 hatte die Konsistenz fließender Kristalle. Sie kristallisierte bei - 10° C aus Aceton aus und schmolz zwischen 43-59° C. Ihr Geruch war leicht aromatisch, der Geschmack etwas bitter, zusätzlich war sie etwas anästhesierend.

Die IR-Spektren (s.Tab.15a/b,S.107/108) beider Substanzen waren sehr ähnlich und glichen denen der Substanzen 1-4. Dies führte zu der Vermutung, daß es sich offenbar auch hier um Gemische von Isobutylamiden handeln könnte.

Im Massenspektrum fanden sich wieder die für Isobutyldienamide charakteristischen Massen bei m/e 152, 166 und 180. Im übrigen lag wiederum ein typisches Alkanspektrum vor. Bemerkenswerte Unterschiede zu den Substanzen 1-4 zeigten die Molekularpeaks. Statt der bekannten Homologenpeaks M^+ 363, 335 und 307, fand sich nun eine Molekularfolge von M^+ 363, 361, 335 und 333 (Substanz 13) bzw. M^+ 361 und 333 (Substanz 17). Dazu traten jeweils die Fragmente $M^+ - 43$ (Isopropyl) und $M^+ - 72$ (Isobutylamin) wieder auf. Die Peaks M^+ 361 und M^+ 333 stammten vermutlich von Verbindungen, die, im Unterschied zu den bereits bekannten Isobutyl-dien-amiden, nochmals zwei Wasserstoffatome weniger enthielten. Bei den isolierten Substanzen sollten demnach Gemische von langkettigen Isobutyl-trien-amiden vorliegen. Substanz 13 enthielt noch Isobutyldienamidverbindungen, während bei Substanz 17 nur Isobutyltrienamide vorlagen.

Daneben waren offensichtlich noch weitere Isobutyldien- und -trienamide vorhanden, denn bei einigen Massenspektren, die von Substanzen aus den Endfraktionen des Isolierungsganges stammten, wurden noch zusätzliche Homologenpaare entdeckt, und zwar Homologe mit den Molekülionen M^+ 349 und M^+ 347 sowie M^+ 377 und M^+ 375. Von diesen könnte jeweils die erste mit einem Isobutyldienamid, die zweite mit einem Isobutyltrienamid in Verbindung gebracht werden.

Das Vorliegen einer dritten olefinischen Doppelbindung bestätigte das H-NMR-Spektrum (s. Tabelle 16 S. 109). Zusätzlich zu den bereits von den Dien-isobutylamiden her bekannten Resonanzen trat ein neues Signal in Form eines Triplets bei $\delta = 5.38$ ppm mit $J = 5$ Hz auf. Es integrierte für zwei Protonen. Der Kopplungsgröße nach zu urteilen, lag cis-Konfiguration vor. Es mußte sich um eine isolierte Doppelbindung handeln, denn das breite Multiplett zwischen $\delta = 1.76$ - 2.72 ppm, in dessen Bereich die Resonanzen von Protonen tertiärer Kohlenstoffe und diejenigen von zu Doppelbindungen nachbarständiger Methylengruppen fallen, entsprachen sieben Protonen, gegenüber dreien bei den Dienamiden. Da die Anzahl der Methylgruppen gleich geblieben war und somit keine weiteren Wasserstoffe an tertiären Kohlenstoffen zu erwarten waren, konnten diese neu auftretenden Protonen nur als Allylprotonen vorliegen.

Ein konjugiertes Trien-System war deshalb nicht zu erwarten, weil im IR keine weitere Verschiebung der Carbonylbande zu niedrigeren Wellenzahlen stattgefunden hatte.

Nach Auszählen der Massen im Massenspektrum konnte man die Doppelbindung in der 9-10 bzw. 10-11- oder in der 13-14- bzw. 14-15-Stellung vermuten, da sowohl die Massen m/e 208 und 276, als auch die paarig, durch zwei Einheiten getrennten Massen m/e 220/222, 234/236, 248/250 und 262/264 in ausreichend deutlicher Intensität vorhanden waren (s. Abb. 7).

Allerdings war nicht auszuschließen, daß es während der Aufnahme des MS zu einer Verschiebung der Doppelbindung gekommen war. Aus den spektralen Daten ließen sich folgende Trienamidstrukturen ableiten.

N-Isobutyl-eicosa-	trans-2-trans-4-cis-x-trienamid	(M ⁺ 361)
"	-octadeca- "	(M ⁺ 333)
"	daneben	
"	-heneicosa-"	(M ⁺ 375)
"	-nonadeca- "	(M ⁺ 347)

wobei x = 9, 10, 13 oder 14 sein könnte.

Interessant war noch die Beobachtung, daß mit zunehmendem Trien-anteil im Gemisch der Schmelzpunkt der Substanz abnahm. Auffallend war der damit sich verstärkende anästhesierende Effekt.

Nachdem unsere Untersuchungen abgeschlossen waren, berichteten Gupta und Mitarbeiter (35) über die Isolierung eines N-Isobutyl-eicosa-trans-2-trans-4-cis-8-trienamids aus *Piper officinarum*. Dieses dürfte aber bezüglich der Lage der isolierten Doppelbindung mit keiner der beschriebenen Verbindungen identisch sein.

3. Substanz 5

Substanz 5 wurde nach der Grobtrennung aus Fraktion C sowie aus Fraktionen, die auf diejenigen der aliphatischen Isobutylamide folgten, gewonnen.

Die Substanz war auf der Dünnschichtplatte erst nach Besprühen mit konz. Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen auf 130-150° C in Höhe der Zone XII, d.h. oberhalb von Zone I, als grauer Fleck sichtbar. Das feinkristalline, weiße Produkt war geruch- und geschmacklos und schmolz bei 82-84° C.

Da das UV-Spektrum keine Absorptionen zeigte, konnten keine konjugierten Doppelbindungen vorhanden sein.

Das Massenspektrum hatte vier Molekülpeaks: M^+ 476, M^+ 448, M^+ 420 und M^+ 392. Offensichtlich handelte es sich bei Substanz 5 wieder um ein Homologengemisch. Aus der Gleichmäßigkeit der Fragmentierung zu schließen, sollte ein reines Alkangemisch vorliegen. Im IR-Spektrum fanden sich dementsprechend keine Schwingungsbanden, die weiteren Funktionsgruppen hätten eindeutig zugeordnet werden können. Im CH-Valenzbereich gab es zwei starke Banden bei 2940 cm^{-1} und 2850 cm^{-1} , die den CH_2 -Schwingungen entsprachen sowie eine schwache (CH_3 -) Schulter bei 2965 cm^{-1} . Eine aufgespaltene, mittelstarke Bande bei 1460-1450 cm^{-1} zeigte Deformationsschwingungen von CH_3 - und CH_2 -Gruppen an. Sehr ausgeprägt war die aufgespaltene $(\text{CH}_2)_4$ -rocking-Bande bei 725 und 717 cm^{-1} . Die schwache Bande bei 1250 cm^{-1} war gleichfalls mit einem mutmaßlichen Alkan vereinbar, denn sie wurde auch bei anderen langkettigen Paraffinen gefunden.

Eine breite Bande bei 795 cm^{-1} deutete auf eine Isopropylgruppierung hin.

Die Summenformeln errechneten sich aus den Molekularpeaks mit $\text{C}_{34}\text{H}_{68}$, $\text{C}_{32}\text{H}_{64}$, $\text{C}_{30}\text{H}_{60}$ und $\text{C}_{28}\text{H}_{56}$. Hierbei stellte sich heraus, daß die Moleküle einfach ungesättigt sein mußten, denn vollständig abgesättigte Verbindungen hätten die allgemeine Formel $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ haben müssen.

4. Substanz 15

Substanz 15 fiel an verschiedenen Stellen des Isolierungsganges an (s. Abb. 2 und 3). Zumeist war es vergesellschaftet mit anderen Substanzen, insbesondere Substanz 8 und 11.

Auf dem DC lag Substanz 15 in Höhe der Zone XI, d.h. zwischen Zone II und III. Nach dem Besprühen mit konz. Schwefelsäure zeigte sich zunächst eine orange Färbung, die kurz darauf über grünlich nach blau umschlug, um dann allmählich in grau überzugehen.

Die Substanz besaß einen Schmelzpunkt bei $135-136^{\circ}\text{C}$, der gelegentlich auch zum Intervall von $146-148^{\circ}\text{C}$ anstieg. Unter dem Mikroskop beobachtete man feine und gröbere, glimmerartig abgeflachte Nadeln. Die Substanz hatte im MS einen Molekularpeak von $M^{+} 414$.

Eine positive Liebermann-Burchard-Reaktion gab den Hinweis auf ein Terpen oder Steroid. Aufgrund des hohen Molekulargewichtes handelte es sich eher um letzteres. Das Fragment $M^{+} - 18$ zeigte die Abspaltung von Wasser an. Da auch im IR-Spektrum eine gut ausgebildete OH-Valenzschwingung zu finden war, lag die Vermutung nahe, daß die Substanz eine alkoholische Gruppe enthielt. Die Substanz war UV-inaktiv. Sie enthielt demnach keine konjugierte Doppelbindung.

Die Fragmentierung im Massenspektrum paßte auf ein Sterol. Durch Vergleich mit einem authentischen Muster konnte endgültig bestätigt werden, daß es sich bei Substanz 15 um ein Sitosterin, $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, handelte. Seine optische Drehung wurde mit $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -25.8^{\circ}$ bestimmt.

Nach den Schmelzpunkten und der optischen Drehung zu urteilen, handelte es sich wahrscheinlich um ein Gemisch von β - und δ -Sitosterin. Die der Literatur (36) entnommenen, vergleichbaren Werte sind:

β -Sitosterin: Schmp. 137°C (Methanol oder Äther),
Schmp. $139-140^{\circ}\text{C}$ (Äthanol) $[\alpha]_{\text{D}} = -36^{\circ}$

δ -Sitosterin: Schmp. $146-147^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}} = -23.9^{\circ}$

5. Piperin, Piperanin, Substanz 11, 12 (und 20)

Diese Substanzen sind durch scharfen Geschmack gekennzeichnet. In dieser Arbeit konnten sie an mehreren Stellen des Trennungsgangs isoliert werden.

Zuerst fiel das, in fast allen Fraktionen dominierende Piperin in hoher Konzentration an. Auf dem DC lief es in die Zone V und konnte mittels Schmelzpunkt, UV-, IR-, H-NMR-, Massenspektrum und durch Vergleich mit einer Testsubstanz identifiziert werden.

Piperanin wurde nur in einer Fraktion, etwa in der Mitte des Isolierungsgangs (Abb. 3), gefunden. Es wurde dünn-schicht-chromatographisch in Zone V durch Vergleich mit einem Substanzmuster nachgewiesen und anhand eines UV- und IR-Spektrums identifiziert.

Substanz 11 wurde vor allem nach Aufarbeitung der Fraktionen B, C und D der Grobtrennung (Abb. 2) isoliert. Auf dem DC lag es im unteren Teil der Platte in Höhe der Zone IX. Es wurde zunächst nur wegen seines scharfen Geschmacks den Scharfstoffen zugeordnet. Das MS mit M^+ 271 legte die Vermutung nahe, daß es sich um ein Piperin-analoges handeln könnte. Ein wesentlicher Unterschied in der Fragmentierung bestand darin, daß anstelle eines Peaks bei m/e 84 (= Piperidin), ein Peak bei m/e 70 (= Pyrrolidin) zu finden war. Möglicherweise handelte es sich bei Substanz 11 um das von Grewe und Mitarbeitern(29) beschriebene Piperylin. Diese Annahme wurde durch den Schmelzpunkt sowie weitere Daten aus UV-, IR- und H-NMR-Spektrum bestätigt.

Substanz 12 wurde teils aus mittleren, teils aus nachfolgenden Fraktionen der Feintrennung von Fraktion A (Abb. 3) gewonnen. Im DC lief sie in die gleiche Höhe wie Piperin (Zone V). Während der Isolierung konnten Substanz-12-haltige Fraktionen insbesondere an dem, im Vergleich zu Piperin unterschiedlichen Absorption- (UV_{254}), Fluoreszenz- (UV_{366})

und Anfärbeverhalten (Besprühen mit konz. H_2SO_4) erkannt werden (s. Tabelle 3).

Charakteristisch waren die, im Mikroskop zu beobachtenden, gelbgrünlich schimmernden, kubischen Kristalle. Der zwischen 144° und 149° C variierende Schmelzpunkt war auch nach mehrmaligem Umkristallisieren nicht konstant zu erhalten. Diese Erscheinung könnte auf eine wechselweise cis-trans-Isomerisierung zurückzuführen sein.

Den Hinweis auf eine weitere, dem Piperin ähnliche Verbindung konnte wieder aus dem Massenspektrum mit M^+ 311 gewonnen werden. Offensichtlich handelte es sich um ein Piperidin-Analoges, da das Fragment m/e 84 wieder auftrat. Wahrscheinlich war die Verbindung mit dem von Spring (28) isolierten Piperettin identisch, da Schmelzpunkt, Kristallform und -farbe sowie UV- und IR-Spektrum den Literaturangaben entsprachen. Die Bestätigung brachten H-NMR- und Massenspektrum.

Eine neue, scharf schmeckende Substanz, die als Öl (Substanz 20) anfiel, wird im nächsten Kapitel beschrieben.

Im folgenden sind die Schmelzpunkte, die dünnschichtchromatographischen und spektralen Daten der Scharfstoffe (Tabellen 14, 15 a/b, 17, S.106-108, 110) sowie die Strukturen zusammengestellt.

Tabelle 2:

Schmelzpunkte der Pfefferscharfstoffe

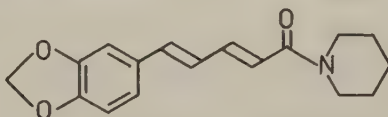
Piperin	129 - 130° C
Piperanin	78 - 79° C
Piperylin	142 - 144° C
Piperettin	144 - 149° C

Tabelle 3:

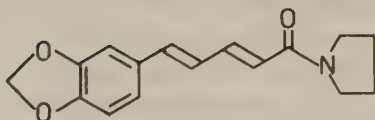
Dünnschichtchromatographische Identifizierung der Pfefferscharfstoffe

	DC-Zone	UV ₂₅₄ -Absorpt.	UV ₃₆₆ -Fluor.	H ₂ SO ₄ conc.
Piperin	V	dunkelviolet	bläulich	gelb [*]
Piperanin	V	dunkelviolet	-	rot od. blau
Piperettin	V	dunkel mit gelbem Zentrum	gelb	braunrot
Piperylin	IX	dunkelviolet	bläulich	gelb [*]
Produkt 20	III	dunkelviolet	schwach bläulich	gelb [*]

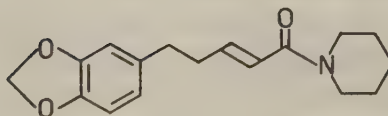
Die mit * gekennzeichneten Färbungen zeigten manchmal eine grünliche Nuancierung.



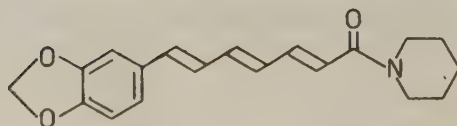
Piperin



Piperylin



Piperanin



Piperettin

6. Substanz 20

Am Ende des Trennungsgangs (s. Schemenbild Abb. 3, S. 13) fiel ein braungelbes, hochviskoses Öl an, das auf dem DC in die Höhe der Zone III wanderte und einheitlich zu sein schien. Es absorbierte im UV₂₅₄ und zeigte im UV₃₆₆ eine leicht bläuliche Fluoreszenz. Nach Besprühen mit konz. Schwefelsäure gab es einen gelben Fleck.

Alle Kristallisierungsversuche schlugen fehl. Das Öl schmeckte scharf, aber bei weitem nicht so brennend wie Piperin selbst.

Im MS (Abb. 8) traten zwei Molekülpeaks bei M^+ 570 und M^+ 572 auf, sowie zusätzlich ein dritter, schwacher bei M^+ 596 (= 570 + 26). Dies legte den Gedanken nahe, daß eine Dimerverbindung des Piperins und dessen Hydrierungsprodukt, und außerdem ein Piperin-Piperettin-ähnliches Dimeres vorliegen könnten. M^+ 570 machte genau das Doppelte des Molekulargewichtes von Piperin (MG 285) aus. Außerdem waren die im niedrigen Massenbereich auftretenden Massenpeaks, insbesondere unterhalb m/e 200, mit denen des Piperins identisch.

Das UV-Spektrum glich dem des Piperins bis auf geringfügige Verschiebungen: Die Benzolbande λ_2 war von 244 nm (Piperin) nach 240 nm, die Bande des $n \longrightarrow \pi^*$ -Übergangs von 310 nm (Piperin) nach 298 nm und die ET-Bande von 340 nm (Piperin) nach 335 nm hin verschoben. Unterschiede betrafen insbesondere die Intensität der Banden.

Das IR-Spektrum ähnelte im wesentlichen dem des Piperins. Die einzelnen Banden waren nur weniger scharf und nicht so gut voneinander abgetrennt. Bemerkenswert war, daß die vom Piperin-, Piperilin- und Piperettin-Spektrum her bekannte, starke Bande bei $1575\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$, die für eine mehrfache Konjugation zum Arylkern spricht, und auch die für eine trans-trans-Doppelbindung charakteristische, sonst stark

ausgeprägte Bande um $990-1010\text{ cm}^{-1}$ fehlten bzw. nur schwach angedeutet waren.

Im Bereich der hohen Massen im MS (Abb. 8) oberhalb m/e 285 fanden sich besonders charakteristische Spaltprodukte bei $M^+ 570 - 85 \rightarrow m/e 485$, $M^+ 570 - (84+28) \rightarrow m/e 458 - 85 \rightarrow m/e 373 - 28 \rightarrow m/e 345$, aber auch bei $M^+ 596 - 85 \rightarrow m/e 511$. Die Abspaltung von 85 bzw. 84 ME könnte mit Piperidin bzw. dem Piperidinon, diejenige von 28 ME mit einer Carbonylgruppe in Zusammenhang gebracht werden. Die darüber hinaus noch sehr charakteristischen Massen m/e 310 und 311 müßten aus den Dimerprodukten d, e, f und o (s. Abb. 9 und 10, S. 37 und 39) hervorgegangen sein. Die unterhalb m/e 285 (=Piperin) auftretende Masse m/e 226, die im monomeren Piperinspektrum nicht vorkam, könnte durch Verlust des Piperidinions aus der Masse m/e 310 ($310 - 84 \rightarrow m/e$ 226) entstanden sein.

Im H-NMR fanden sich die beiden breiten, vom Piperin her bekannten Methylen-signale des Piperidinrings bei $\delta = 1.64$ und $\delta = 3.60\text{ ppm}$, die, bei der Annahme, daß es sich um ein reines Dimerprodukt handelte, hier für 12 bzw. 8 Protonen integrierten. Die Methylen-gruppen zweier Methylen-dioxy - gruppen erschienen als scharfes Singulett bei $\delta = 5.99\text{ ppm}$ ($= 4\text{ H}$). Die aromatischen Protonen fielen in einer Resonanz bei $\delta = 6.87\text{ ppm}$ ($= 6\text{ H}$) zusammen. Der Bereich der vinyli-schen Protonen dehnte sich über ein weites Feld von $\delta = 5.92 - 7.86\text{ ppm}$ aus. Hierfür ließen sich aus der Integrationskurve 7 - 8 Protonen ermitteln. Außerdem gab es noch ein breites Multi-plett um $\delta = 2.25\text{ ppm}$ für etwa 2 Protonen. Es handelte sich offensichtlich um Methinprotonen oder um eine Methylen-gruppe, die einer Carbonylfunktion oder Doppelbindung benachbart war.

Ferner enthielt das Spektrum ein nicht zu deutendes Multi-plett um $\delta = 1\text{ ppm}$.

Da der Aromatenbereich gegenüber dem des Piperinsspektrums keine Änderung zeigte, mußte die Verknüpfung zum Dimerprodukt sehr wahrscheinlich an den Vinylprotonen erfolgt sein. Sie könnte, zumindest für die nicht hydrierten Dimerprodukte mit einem M^+ von 570 unter Cyclisierung oder einfacher Verkettung und Protonenwanderung stattgefunden haben.

Im ^{13}C - Spektrum (Tab. 20, S.113) traten außer den, vom Piperin (Tab. 19, S.112) her bekannten Signalen, eine Reihe zusätzlicher Resonanzen auf. Auch im aliphatischen Bereich wurden außer den Piperidin-Kohlenstoffatomen neue C-Atome angezeigt. Bei den vinyllischen C-Atomen errechnete sich der größte, relative Intensitätsverlust (Peakintensität Substanz 20 / Peakintensität Piperin) für die α - und β -Kohlenstoffatome.

Dimerisierungen werden häufig als Folge von photochemischen Reaktionen beobachtet. Um einen diesbezüglichen Einfluß des Lichtes auf Piperin näher studieren zu können, wurden verschiedene Bestrahlungsversuche durchgeführt. Durch Bestrahlung mit langwelligem UV_{366} -Licht konnte, auch nach einwöchiger intensiver Einwirkungsdauer, lediglich eine cis-trans-Isomerisierung erreicht werden. Dies haben Kluge und Lillya (37) bei entsprechenden Versuchen mit einer Vielzahl von Dienonen sowie De Cleyn und Verzele (38) speziell beim Piperin zur Darstellung von cis-trans-Isomeren ausgenutzt. Dagegen ergab Bestrahlung von Piperin mit kurzwelligem UV_{254} -Licht ein MS, das einen Molekularpeak von $M^+ = 570$ hatte und in der Fragmentierung auf ein Gemisch von Piperin-Dimeren unterschiedlicher Verknüpfung hinwies.

Ein ähnliches Massenspektrum wurde von Piperin erhalten, das ein halbes Jahr, in Äthanol gelöst, dem Tageslicht (keine direkte Sonnenbestrahlung) ausgesetzt war.

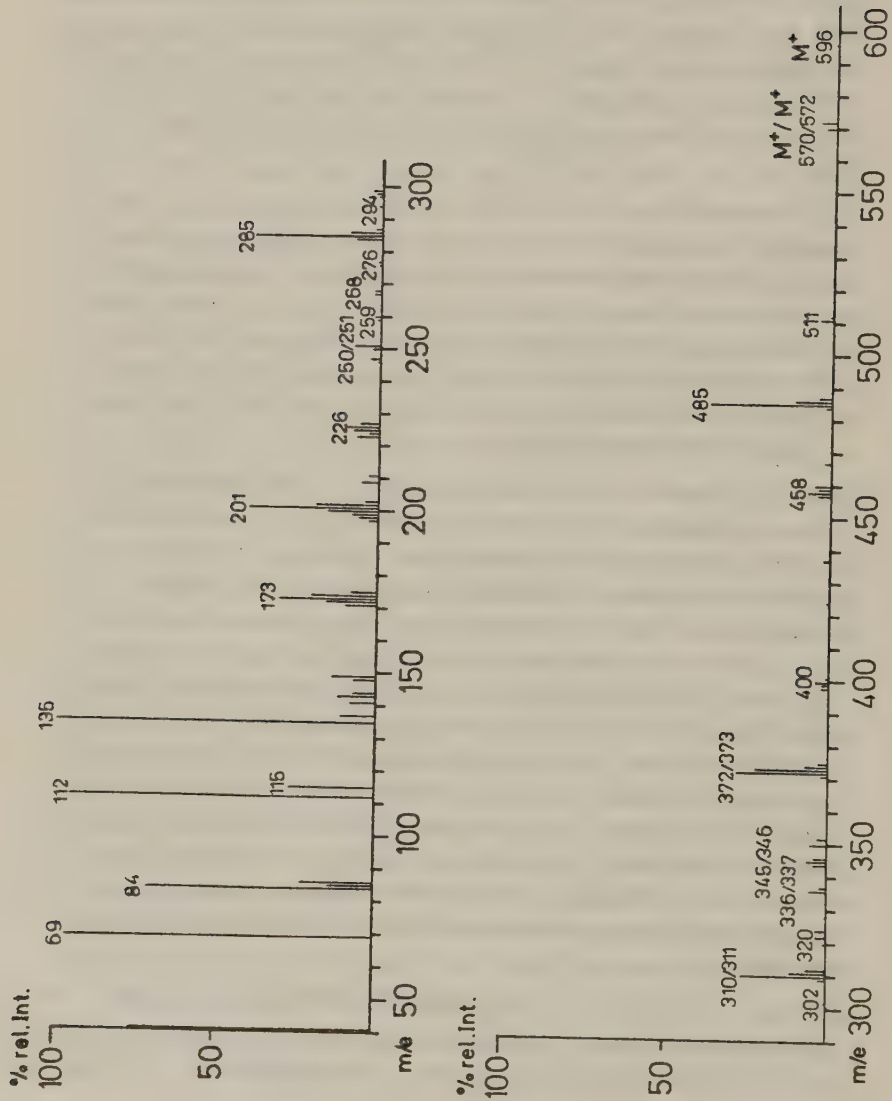


Abb. 8 Massenspektrum der Substanz 20

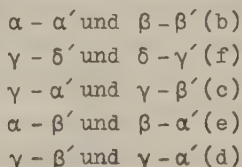
Die künstlich erzeugten Dimerprodukte unterschieden sich im MS von den isolierten dadurch, daß nur die isolierten zusätzlich zu M^+ 570 die Molekularpeaks M^+ 572, d.h., das mit zwei Wasserstoffen hydrierte und M^+ 596, das offenbar um eine Doppelbindung erweiterte Piperin-Dimere, enthielten. In den übrigen Fragmentionen waren, abgesehen vom fehlenden Ion m/e 511, das im isolierten Produkt aus M^+ 596 entstanden war, und von Intensitätsunterschieden, keine Veränderungen aufgetreten.

Hinweise über die mögliche Verknüpfungsart in dem Piperindimerprodukt sollten analoge Dimerverbindungen der Literatur geben. Allgemein wird eine Dimerverbindung als ein kovalent gebundenes Paar gleicher Moleküle definiert (39). Bei einem "echten" Dimer sind die zwei Hälften identisch. Diese sind über "Äquivalente", d.h. gleichwertige Atome miteinander verknüpft und das Dimer steht auf der gleichen Oxidationsstufe wie die beiden monomeren Vorläufer. In diesem Sinne zählen auch die Piperindimeren zur Gruppe der "echten" Dimeren, da die Verknüpfung der beiden Piperinmoleküle offenkundig über die α , β , γ oder δ -Protonen stattgefunden hat und diese als zumindest nahezu gleichwertig betrachtet werden können:



Stobbe und Mitarbeiter (40) haben die Dimerprodukte verschiedener Cinnamylidenderivate untersucht und gefunden, daß sich Phenylbutadien-säuren und Phenylbutadien-ketone unterschiedlich verhalten. Die ersteren dimerisieren unter Bildung eines Cyclobutanringderivats, während bei der zweiten Gruppe eine einfache Verkettung unter gleichzeitiger Protonenwanderung eintritt. Protonenwanderung wurde von β nach α' beobachtet unter gleichzeitiger β - β' -Verknüpfung und Aufhebung einer Doppelbindung. Mustafa (41)

hat andererseits die Cyclobutanringbildung auch bei Cinnamylidenacetophenon festgestellt. Nach ihren Beobachtungen (40, 41) setzt die Cyclisierung bevorzugt in den folgenden Stellungen ein (s.auch Abb. 9):



Allein das $\gamma - \gamma'$ und $\delta - \delta'$ -Isomere (a) bleibt unerwähnt.

Diese "head-to-head-Variante" ist offensichtlich aus sterischen Gründen nicht bevorzugt, obgleich ein vergleichbares Derivat vom trans-trans-Sorbinsäuremethylester (42) und von der Zimtsäure (43) her bekannt ist. Daß sterische Einflüsse eine entscheidende Rolle spielen, konnten auch Cohen und Mitarbeiter (44) zeigen. Sie bestrahlten das 1-Dichlorphenyl-4-Phenylbutadien und erhielten als Reaktionsprodukt nur das 3,3'-4,4'-Cyclobutanderivat. Die großen Chloratome nehmen soviel Platz ein, daß sich die diesem Phenylrest benachbarten Vinylgruppen nicht mehr soweit nähern können, damit eine neue Bindung zustande kommt. Ferner haben sie festgestellt, daß der Chlor-substituierte Phenylrest im Vergleich zum unsubstituierten besonders weit aus der sonst planaren Butadienebene herausgedreht ist, so daß dadurch die Reaktion an der Dichlorstyroldoppelbindung verhindert wird.

Ein ähnlicher Effekt könnte auch für die Cyclisierung von Piperin gelten. Auch die Methylendioxygruppen beanspruchen einen großen Raum und werden den Arylkern entsprechend veranlassen, aus der Dienebene herauszudrehen. Nach dem MS könnte zwar auch dieses, wenig wahrscheinliche Isomere vorliegen. Im übrigen erschienen gleichfalls die charakteristischen Fragmente aller anderen Cyclobutan-Isomere, wenn auch in unterschiedlicher Intensität.

In der folgenden Übersicht (Abb. 9) sind die möglichen Cyclobutan-Isomere zusammengestellt.

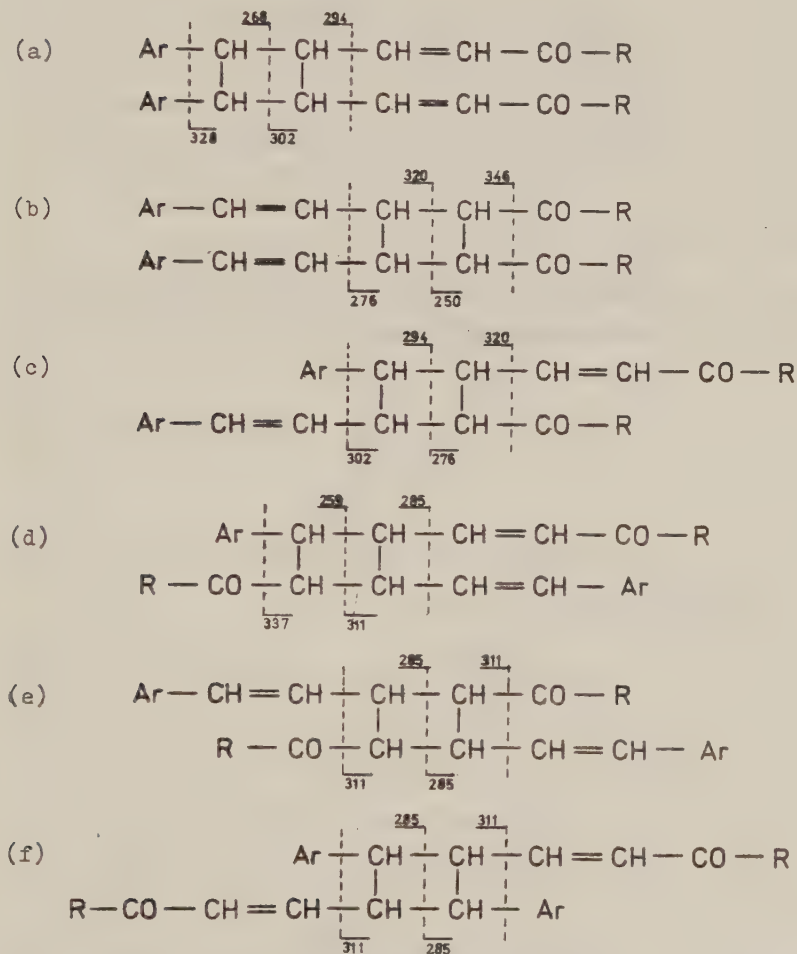


Abb. 9

Piperin-Dimere mit Cyclobutanring

Ar = Methylendioxyphenyl

R = Piperidin

Außer unter Cyclisierung könnte Piperin möglicherweise auch durch einfache Verkettung und einen dadurch bedingten Platzwechsel eines Wasserstoffatoms dimerisiert sein, da es als tertiäres Säureamid nicht unbedingt wie eine Phenylbutadiensäure zu reagieren brauchte. Dies würde zu Trienderivaten geführt haben, die neben einer einzelnen, mit der Carbonylgruppe oder dem Aromaten verknüpften Doppelbindung - unter Entstehung eines Enons oder eines Styrols - noch ein konjugiertes Doppelbindungssystem wie im Piperin enthalten.

Mögliche Isomere sind in Abb. 10 zusammengestellt.

Ihre wesentlichen Fragmente wären im MS mit den charakteristischen Massen aus den Cyclisierungsprodukten identisch.

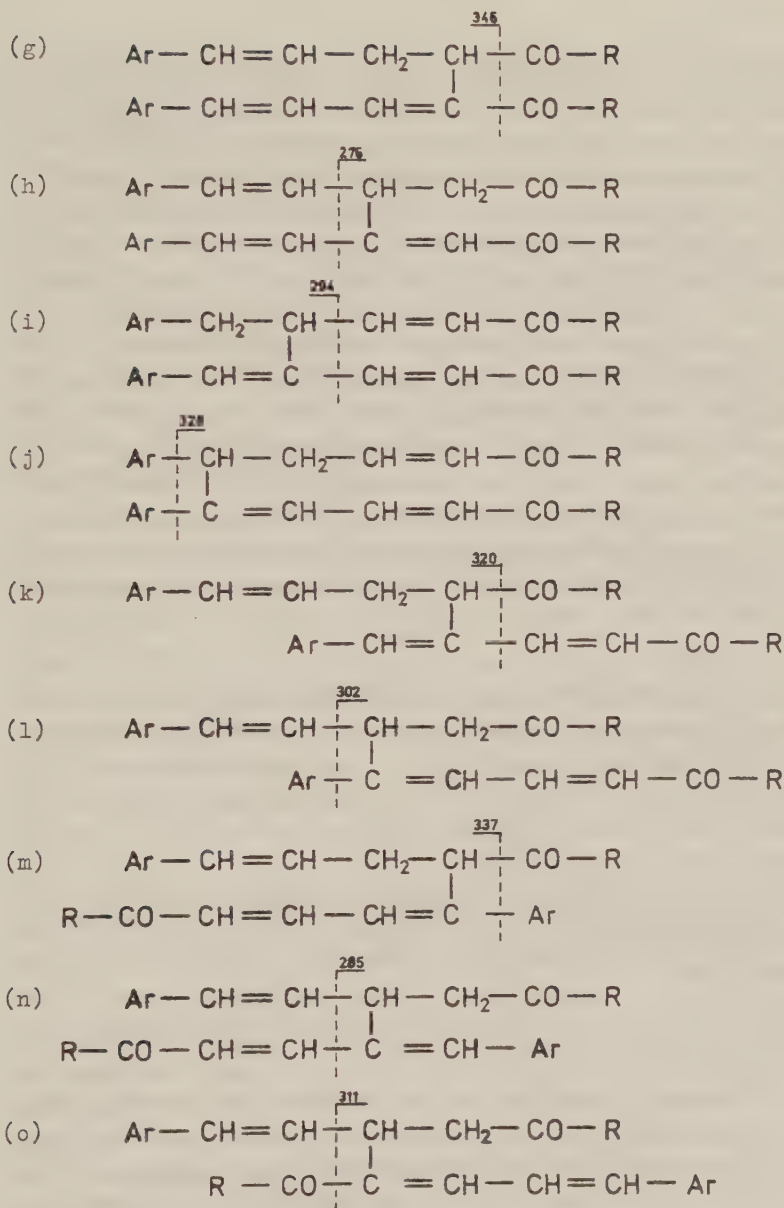


Abb. 10

Piperin-Dimere unter einfacher Verkettung u. Protonenwanderung

Nach dem ^{13}C -Spektrum wäre eine Deutung für beide Dimerisierungsarten möglich. So könnten die Signale bei 38.8, 40.5, 43.7 und 44.3 ppm wechselweise Cyclobutankohlenstoff- oder einem Methylenkohlenstoffatom zugeordnet werden, während die Resonanz bei 55.9 ppm eher für ein nicht cyclisch gebundenes, tertiäres C-Atom sprach, das bei einfacher Verkettung auftritt. Da die Intensitäten all dieser Signale mit 18 - 23, gegenüber dem Kohlenstoff der Methylenedioxygruppe mit einer Intensität von 193, vergleichsweise klein war, konnte vermutet werden, daß nur ein Teil der Substanz 20 als Dimerisierungsprodukt vorlag. Der größte Teil bestand offenbar lediglich aus cis-trans-Isomeren des Piperins, neben einem sehr geringen Anteil an trans-trans-Piperin, das sich bis zur Aufnahme der Spektren aus der isolierten Substanz nach einer Gleichgewichtsreaktion wieder zurückgebildet haben mußte, weil es in der frisch isolierten Substanz dünnschichtchromatographisch nicht nachweisbar war.

Da die Signale der α - und β -Kohlenstoffe relativ zum Piperin-Spektrum am meisten an Intensität verloren hatten, lag die Vermutung nahe, daß eine Isomerisierung bzw. Dimerisierung bevorzugt an diesen Stellen stattgefunden hatte. Dies würde mit den Erfahrungen von Stobbe (40) und Mustafa (41) übereinstimmen.

Ein Gemisch von Isomerisierungs- und Dimerisierungsprodukten würde auch den Ergebnissen der anderen Spektrenanalysen entsprechen.

So war im IR-Spektrum die trans-trans-Doppelbindungsbande weitgehend unterdrückt.

Im UV-Spektrum gaben die molaren Extinktionen Hinweise für die Zusammensetzung von Substanz 20, für die zur Berechnung ein Molekulargewicht von 570 zugrunde gelegt wurde. Die molaren Extinktionen der Benzolbanden nahe 240 nm waren:

$E_{\text{mol}} = 3337$ (Piperin) bzw. $E_{\text{mol}} = 5672$ (Substanz 20), und der ET-Banden nahe 340 nm: $E_{\text{mol}} = 27547$ (Piperin) bzw. $E_{\text{mol}} = 29871$ (Substanz 20).

Unter der Voraussetzung, daß bei Substanz 20 alle Doppelbindungen erhalten geblieben wären, hätte man die doppelte Extinktion erwarten können. Tatsächlich aber errechnete sich, sofern man die Untergrundabsorption unberücksichtigt läßt, für die Benzolbande eine Extinktionsabnahme von ca. 15 % und für die ET-Bande eine solche von 46 %. Andererseits hätte bei einem 100 %igen Cyclobutan-Dimeren die ET-Bande völlig unterdrückt sein müssen und bei einem 100 %igen einfachen "Verkettungsprodukt" nur noch eine 50 %ige Absorption auftreten dürfen.

Im H-NMR wurde nur ein geringer Verlust an vinylischen Protonen, etwa 10 - 15 %, ausgewiesen, dem 1-2 Methin- bzw. zu Doppelbindungen nachbarständige Methylenprotonen gegenüberstanden.

Eine endgültige Klärung bezüglich des prozentualen Anteils brachte die Molekulargewichtsbestimmung. Danach hatte Substanz 20 ein durchschnittliches Molekulargewicht von 349, d.h., daß etwa 22 - 23 % an Dimerprodukt enthalten waren. Diesen Anteil haben wir als

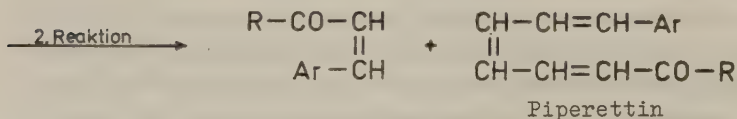
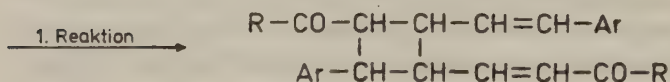
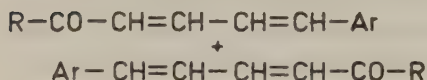
D i p e r i n

bezeichnet, wobei die überwiegende Menge wahrscheinlich als Dimeres mit einfacher Verkettung vorlag. Der Rest bestand zur Hauptsache aus cis-trans-Isomeren des Piperins, neben Spuren von unverändertem trans-trans-Piperin.

Dimerprodukte kommen in der Natur häufig vor (39). Äthylenverbindungen können, wie bereits aufgezeigt wurde, durch Lichteinflüsse - und auch Hitze - unter Bildung eines Cyclobutanrings oder durch einfache Verkettung dimerisieren. Die Pfefferfrucht ist nicht nur bis zur Gewinnung an der Pfefferrebe selbst, sondern auch nach der Ernte beim

Trocknen direkter Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Inwieweit Lichteinflüsse während der Aufarbeitung und Isolierung der Pfefferinhaltsstoffe Dimerisierungsprozesse ausgelöst haben, konnte nicht geklärt werden.

Abschließend sei noch bemerkt, daß sich Labruyère (45) das Piperettin im Zuge einer Dimerisierung-Depolymerisierung aus Piverin entstanden denkt, und zwar nach dem Schema



Einer, auf diesem Reaktionsmechanismus beruhenden Synthese könnte auch die im folgenden besprochene Gruppe an Pfefferinhaltsstoffen ihre Entstehung verdanken. (s. dort)

7. Substanzen 6, 7 und 8

Die Substanzen 6, 7 und 8 konnten aus den mittleren Fraktionen des Isolierungsganges, s. Abb. 3, erhalten werden. Besonders rein waren sie in den Endfraktionen des Trennungsganges, aus denen sie bereits unmittelbar nach Durchtritt aus der Säule in den Fraktionsgläsern ausfielen. Aus den übrigen Fraktionen mußten sie nach Abdampfen des Elutionsmittels sowie nach Aus- und Umkristallisieren aus Aceton oder Äther bei -10°C gewonnen werden. Sie kristallisierten in Form feiner, weißlicher Nadeln oder Glimmerstückchen aus.

Die Substanzen waren geruch- und geschmacklos, erzeugten aber nach einiger Zeit auf der Zunge und an den Schleimhäuten ein anästhesierendes Gefühl.

Auf dem DC lagen die Substanzen wenig voneinander getrennt in den Zonen III (Substanz 6), XI (Substanz 8) und II (Substanz 7). Sie gaben im kurzwelligen UV-Licht Fluoreszenzminderung, im langwelligen UV-Licht waren sie ohne Eigenfluoreszenz. Beim Besprühen mit konz. Schwefelsäure färbten sie sich braunrot (Substanz 6), dunkelrot (Substanz 8) bzw. hellrot (Substanz 7) an.

Die Schmelzpunkte einiger isolierter Fraktionen waren nicht ganz exakt, sondern zeigten ein mehr oder minder ausge dehntes Intervall. Nach den DC-Befunden handelte es sich hierbei um Substanzgemische. Bei anderen, vor allem den oben erwähnten Endfraktionen, gelang es, Substanzen mit definiertem Schmelzpunkt zu erhalten, und zwar $135-136^{\circ}$ (Substanz 6), $124 - 125^{\circ}$ (Substanz 8) und $114 - 116^{\circ}\text{C}$ (Substanz 7).

Nach den hochauflösenden Massenspektren besaßen die Substanzen die nachstehenden Molekulargewichte und Summenformeln:

Substanz 6	327,177	$C_{20}H_{25}O_3N$
Substanz 8	355,214	$C_{22}H_{29}O_3N$
Substanz 7	383,247	$C_{24}H_{33}O_3N$

Da sich die Formeln nur jeweils um eine C_2H_4 -Einheit voneinander unterschieden, schien es sich bei den Substanzen wiederum um Homologe zu handeln.

Die UV-Spektren aller isolierten Substanzen waren weitgehend gleich. Auch die IR-Spektren glichen sich und erinnerten in vieler Hinsicht an die der langkettigen Isobutylamide und der Pfefferscharfstoffe (Tabelle 15 a/b, S.107/108).

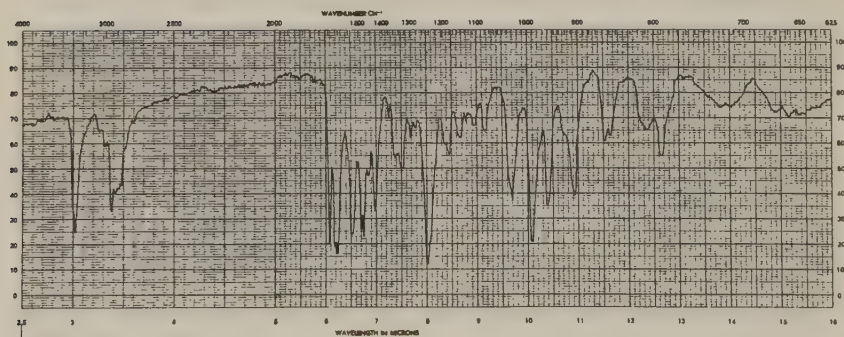


Abb. 11

IR-Spektrum der Substanz 6

Im Valenzschwingungsbereich lag eine deutliche Resonanz bei 3300 cm^{-1} , die auf eine N-H-Schwingung hindeutete. In Verbindung mit den Absorptionen bei 3080 und 1650 cm^{-1} sollte ein sekundäres Amid vorliegen, das aufgrund der Bande bei 1540 cm^{-1} offenkettig zu sein schien. Bei 1620 und 1600 cm^{-1} traten zwei starke Banden auf, von denen die eine die zum Amid gehörige Carbonylschwingung darstellte, während die andere olefinischen und/oder aromatischen Doppelbindungsschwingungen zuzuordnen war. Eine starke Bande bei 990 cm^{-1} sprach für eine konjugierte trans-trans-Doppelbindung. Diese und das Amidsystem mußten direkt miteinander verbunden sein, da die Lage der Hauptbande in den UV-Spektren, die durch vergleichbare Werte von den langkettigen Isobutyldienamiden bereits bekannt war, ein Dienonsystem vermuten ließ.

Die Substanz mußte aufgrund der Skelett-Schwingungen bei 1490 und 1480 cm^{-1} , der in-plane bei 1120 bis 1085 cm^{-1} und der out-of-plane C-H-Deformations-Schwingungen bei 860 und 800 cm^{-1} einen aromatischen Teil besitzen.

Starke Banden bei 1250 , 1030 und 915 cm^{-1} wiesen auf eine C-O-Schwingung, vermutlich einen Äther hin.

Weitere Informationen brachten die H-NMR-Spektren (Tabelle 18, S.111). Diese stimmten bis auf die Signalgruppe bei $\delta = 1.4\text{ ppm}$ im wesentlichen überein. Die Spektren zeigten in allen Bereichen Beziehungen zu den aliphatischen Isobutyramidien und den Pfefferscharfstoffen. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, daß die Substanzen 6, 7 und 8 aus Strukturelementen der beiden Verbindungsklassen zusammengesetzt sein mußten.

Im aromatisch-vinylischen Frequenzbereich sprachen Signale bei $\delta = 5.7 - 7.4\text{ ppm}$ für den ungesättigten Charakter der Verbindungen. Sie integrierten für insgesamt 11 Protonen. Neben dem Aromatendublett bei $\delta = 6.8\text{ ppm}$ mit $J = \text{Hz}$ (3H), fanden sich noch weitere Doppelbindungsresonanzen mit

Kopplungsgrößen von 10 und 15 Hz. Diese Werte entsprachen denen, bei den langkettigen Isobutyldienamiden her bekannten trans-trans-Dienongruppierungen. Ein Singulett bei $\delta = 5.93$ ppm (2 H) wies auf eine Methylenedioxygruppe hin. Die übrigen sechs Protonen mußten vinyllischen Ursprungs sein. Hiervon entfielen vier auf das, dem UV-Spektrum zu entnehmenden Dienonsystem. Die zwei restlichen Protonen konnten keiner isolierten Doppelbindung angehören, da sonst das Multiplett (= 4 H) bei $\delta = 2.17$ (Substanz 7 und 8) bzw. $\delta = 2.31$ ppm (Substanz 6) für die benachbarten Methylenprotonen für sechs Protonen hätte integrieren müssen. Somit dürfte eine Methylengruppe an das Dienonsystem angegliedert und eine zweite mit der zusätzlichen Doppelbindung verbunden sein. Die andere Nachbarschaft dieser Doppelbindung war offensichtlich ein Aromat, da eine entsprechende, vielfach als Styrolbande gedeutete Absorption auch im IR-Spektrum bei etwa 960 cm^{-1} auftrat.

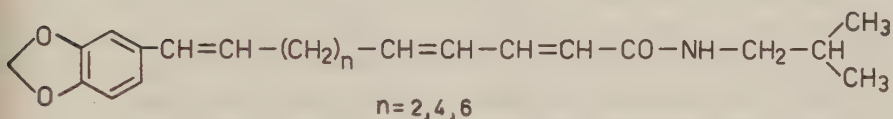
Das Proton des sekundären Amids gab sich durch eine breite Resonanz bei ca. $\delta = 5.5$ ppm zu erkennen. Diese verschwand bei Deuteriumsaustausch unter gleichzeitiger Umwandlung des Triplettts bei ca. $\delta = 3.2$ ppm in ein Dublett, das für zwei Protonen integrierte und eine zum Stickstoff nachbarständige Methylengruppe anzeigte.

Im hohen Feld, im Resonanzbereich der Methylprotonen, lag im Unterschied zu den langkettigen Isobutyldienamiden dieses Mal ein symmetrisches Dublett mit der Kopplung von $J = 6$ Hz. Es integrierte für 6 Protonen, d.h. zwei Methylgruppen. Die Vermutung, daß wieder eine Isopropyl- bzw. Isobutylen-Gruppe im Molekül vorhanden war, wurde durch das zugehörige H am tertiären Kohlenstoffatom ($\delta = 1.8 - 2.0$ ppm) bestätigt.

Damit dürften zwei prinzipielle Bauelemente, ein Methylendioxytyrol- und ein Isobutyldienamid-Baustein vorhanden sein. Zusätzlich sollten zwei allylische Methylengruppen

vorliegen. Über die mögliche Verknüpfung dieser Elemente gaben die bei $\delta = 1.4$ ppm erscheinenden Methylenprotonenresonanzen Auskunft. Sie integrierten bei Substanz 7 für acht Protonen, bei Substanz 8 für vier Protonen und fehlten gänzlich bei Substanz 6. Damit unterschieden sich die Substanzen vermutlich nur in der aliphatischen Zwischenkette.

Daraus ergab sich ein mutmaßlicher Strukturaufbau mit folgender allgemeiner Formel:



Die Massenspektren ließen erst nach näheren Untersuchungen die für diesen Verbindungstyp charakteristischen Fragmente, oft in Form von halben Massen oder metastabilen Peaks auffinden.

Im Massenspektrum von Substanz 6 (Abb. 12 und 13) trat als intensivster Ionenpeak das Spaltstück m/e 161 auf, das gemäß den Studien von Grewe und Mitarbeitern⁽²⁹⁾ einem Allylmethylenedioxybenzolfragment zuzuordnen war und das anschließend nacheinander $\text{CH}_2\text{O} \longrightarrow m/e$ 131 und $\text{CO} \longrightarrow m/e$ 103 aus der Methylenedioxygruppe verlor. Die Masse m/e 162 entstand wahrscheinlich durch Protonenanlagerung aus dem Fragment m/e 161. Die Verschiebung der Doppelbindung im Molekül ermöglichte die Spaltung in Benzylstellung unter Bildung eines Methylenedioxytropyliumions, m/e 135, das im Vergleich zum entsprechenden Fragment der nachfolgend zu besprechenden Substanzen eine relativ geringe Intensität hatte. Das entsprechende Komplementärfragment fehlte vollständig. Die Struktur des aromatischen Teils von Substanz 6 konnte dennoch als bestätigt gelten.

Anders sah es für die Isobutyldienamidgruppierung aus, wenn man von den sehr intensiven Spaltstücken m/e 43 und 44 sowie 57, eine Isopropyl- bzw. Isobutylgruppe, absieht. Die

aufgrund der Erfahrung bei langkettigen Isobutyldienamiden für Säureamide dieses Typs zu erwartenden charakteristischen Fragmente m/e 152, 166 und 180, konnten nicht als solche gefunden werden. Zu m/e 152 gehörte ein metastabiler Übergang bei $m^* 112,9$, ein eben angedeutetes diffuses Signal, das zum Endion m/e 131 zerfallen konnte. Das gleiche Fragment entstand auch beim Abbau des Allylmethyldioxybenzols, s. oben. Das Fragment m/e 166 wurde nicht gefunden. Vielleicht entstand aus ihm durch Verlust eines Protons die Masse m/e 165, die mit einem später diskutierten Endion identisch war. M/e 180 trat wiederum in Form eines metastabilen Ions auf. Dies zerfiel über den Übergang $m^* 78,672$ zum Endion m/e 119. Die für Säureamide typische Spaltung der Amidbindung, d.h. zwischen Carbonylgruppe und Amidstickstoff, konnte zunächst nicht gefunden werden. Sie hätte das Massension $M^+ - 72$ (Isobutylamin) $\rightarrow$ m/e 255 ergeben müssen. Stattdessen fand sich ein Peak bei der halben Masse m/e 127,5. M/e 255 zerfiel dann weiter unter Abspaltung eines Tropyliumions. Das resultierende Fragment wurde wiederum nur als halbe Masse registriert: $(255 - 135)$ dividiert durch 2 $\rightarrow$ m/e 60.

Ausgehend von m/e 255 gab es offensichtlich noch einen zweiten Zerfallsweg. Er verlief über ein breites, diffuses Übergangssignal, $m^* 106,765$, zum Endion m/e 165. Dieses Spaltprodukt wurde schon oben erwähnt.

Das Massenspektrum von Substanz 6 lieferte noch zusätzliche Daten, die die hypothetische Formel unterstützten. Nimmt man an, daß die Spaltung des Moleküls von beiden Seiten her gleichzeitig einsetzt, $M^+ - 121$ (Methyldioxybenzylion) - 57 (Isobutylion), so entsteht das Fragment m/e 149. Dieses zerfällt weiter nach

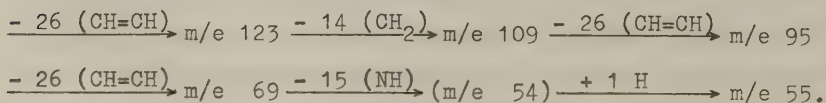


Abb. 12

Zerfallsschema der
Substanz 6, M^+ 327

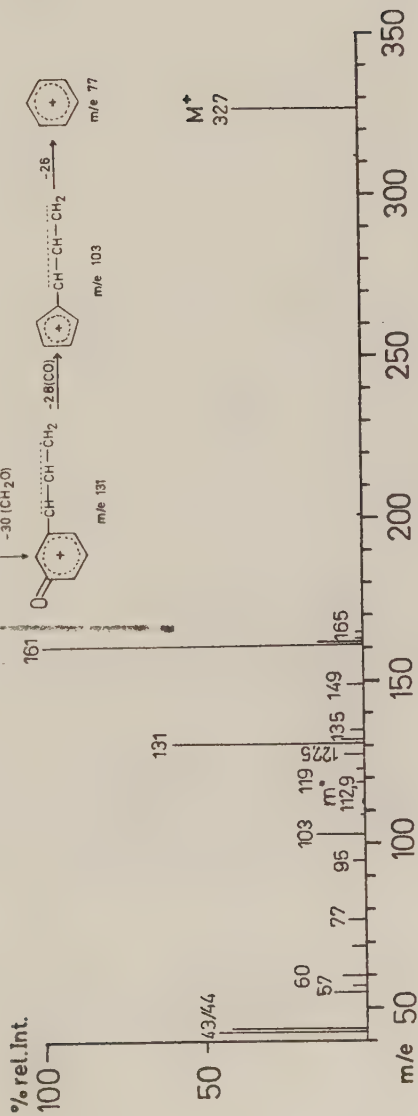
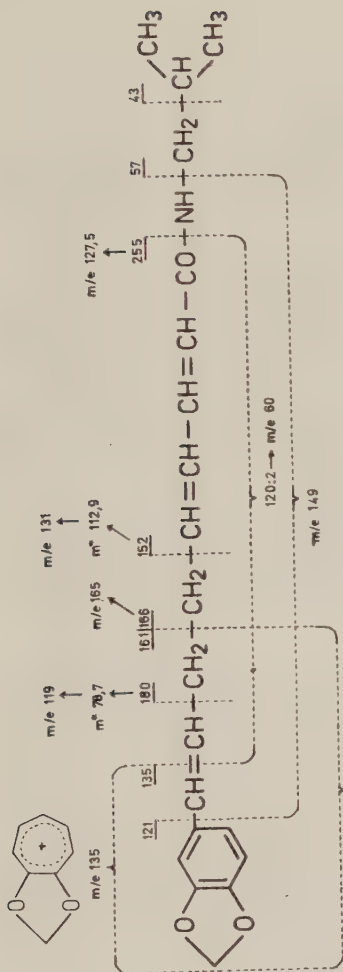


Abb. 13. Massenspektrum der Substanz 6

Das Massenspektrum von Substanz 8 (Abb. 14 und 15) mit M^+ 355 enthielt alle typischen Spaltprodukte eines N-Isobutyldienamids, das über eine aliphatische Kette mit einem Methylendioxytyrolrest verbunden ist.

Außer dem Molekülion, das nach seiner relativen Intensität (= 100 %) nach zu urteilen, sehr stabil sein mußte, waren besonders die Fragmente m/e 135 (Methylendioxytropyliumion) und das entsprechende Komplementärion m/e 220 auffallend. Letzteres, das bei Substanz 6 nicht auftauchte, zerfiel weiter unter Spaltung der Amidbindung: $220 - 72$ (Isobutylamin) $\longrightarrow m/e$ 148.

Der bereits bei Substanz 6 besprochene Weg über die Allylsplattung mit m/e 161 $\longrightarrow m/e$ 131 $\longrightarrow m/e$ 103 ließ sich ebenfalls nachvollziehen. Offensichtlich war bei Substanz 8 auch die direkte Abspaltung eines Methylendioxybenzolions aus dem Molekül möglich (m/e 121).

Die ein aliphatisches Isobutyldienamid kennzeichnenden Massen m/e 152, m/e 166 und m/e 180 traten als solche auf. Auch die davon abgeleiteten, das Dienamidsystem einschließenden Fragmente m/e 81 und 95/96 wurden gefunden.

Ausgehend vom Gesamtmolekül hätte eine einfache Amidspaltung das Gegenion $M^+ - 72 \longrightarrow m/e$ 283 liefern müssen, das gleich Substanz 6 doppelt geladen zu sein schien, weil es nur als halbe Masse m/e 141,5 registriert wurde.

Sehr intensiv waren wiederum die einer Isopropyl- und Isobutylgruppe zuzuschreibenden Fragmente m/e 43/44 und 57. Abspaltung der Isobutylgruppe und gleichzeitiger Abbau des Methylendioxyrings konnten zum Fragment $M^+ - 57 - 30$ (CH_2O) - 28 (CO) $\longrightarrow m/e$ 240 führen.

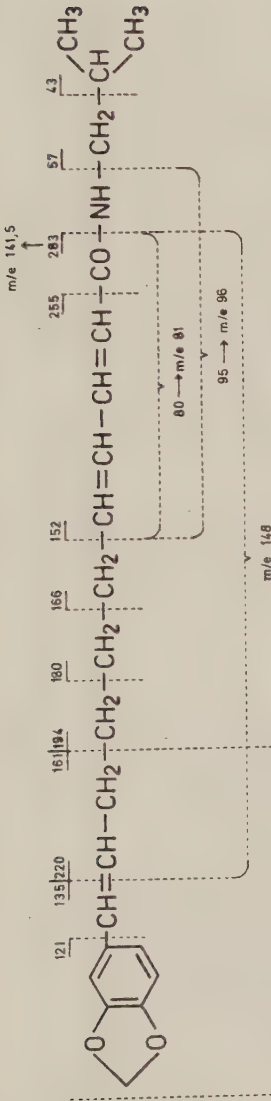


Abb. 14

Zerfallsschema der Substanz 8, M^+ 355

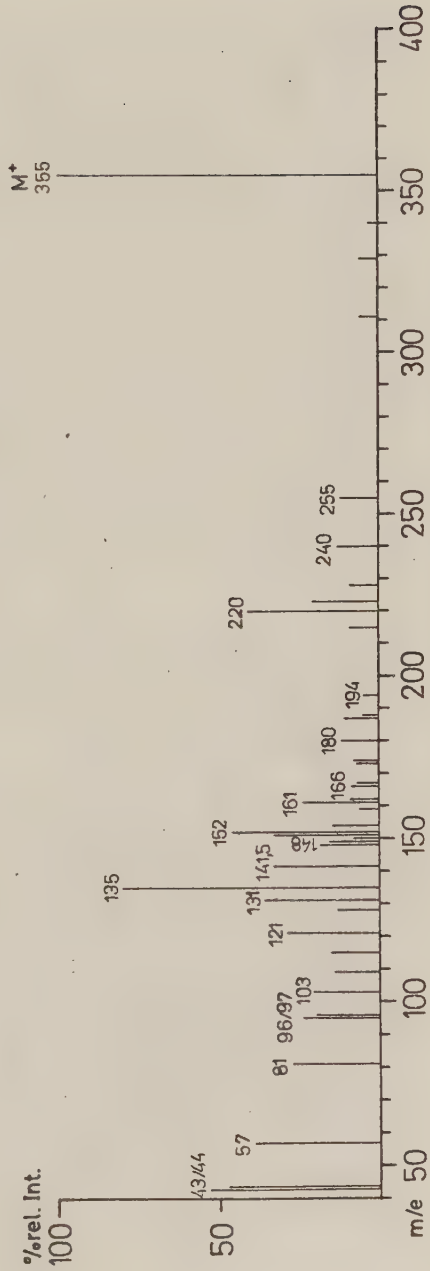


Abb. 15 Massenspektrum der Substanz 8

Substanz 7 hatte im MS (Abb. 16 und 17) einen Molekularpeak von M^+ 383.

Das Vorliegen eines Isobutyldienamidsystems wurde wiederum durch die Fragmentfolge m/e 152, 166 und 180 sowie m/e 43/44 und 57 bestätigt. Die nach einfacher Amidspaltung zu erwartende Masse m/e 311 aus $M^+ - 72$ (Isobutylamin) war ebenso wenig nachweisbar, wie ein doppelt geladenes Ion mit halber Massenzahl. Dafür fand man einen Ionenpeak bei m/e 150 bzw. $\frac{+H}{-}$ m/e 151, den man sich durch zusätzlichen Verlust eines Allylmethylendioxybenzylrestes aus m/e 311 entstanden denken konnte.

Durch gleichzeitige Fragmentierung von den beiden Enden des Moleküls her, also $M^+ 383 - 135$ (Methylendioxytropyliumion) - 57 (Isobutylion) mußte das Fragment m/e 191 entstanden sein. Dieses schien bevorzugt in der Mitte zu zerbrechen und die sehr intensiven Peaks m/e 95, 96 und vor allem m/e 97 zu liefern.

Nach Abspaltung des Fragments m/e 135 dürfte das mit Substanz 8 vergleichbare Komplementärfragment m/e 248 entstanden sein. Dieses lieferte dann nach anschließender Amidspaltung und Protonenaufnahme durch die Carbonylfunktion das Massenieon m/e 177.

Das Allylmethylendioxybenzylion mußte der Masse m/e 161 entsprechen. Sein weiterer Abbau mündete, anders als bei Substanz 6 und 8, im Bruchstück m/e 105. Der Spaltprozeß könnte in zwei Richtungen erfolgt sein: Abspaltung eines Formylrestes aus dem Methylendioxyring und dann einer olefinischen Gruppe aus der Allylfunktion oder umgekehrt. Als Komplementärfragment zu m/e 161 könnte das, entweder durch Protonenaufnahme oder einen metastabilen Übergang entstandene Fragment m/e 223 gedeutet werden. Das Übergangssignal m^* war als breiter Peak zwischen m/e 161 und etwa m/e 159,9, theoretisch 159,9, erkennbar.

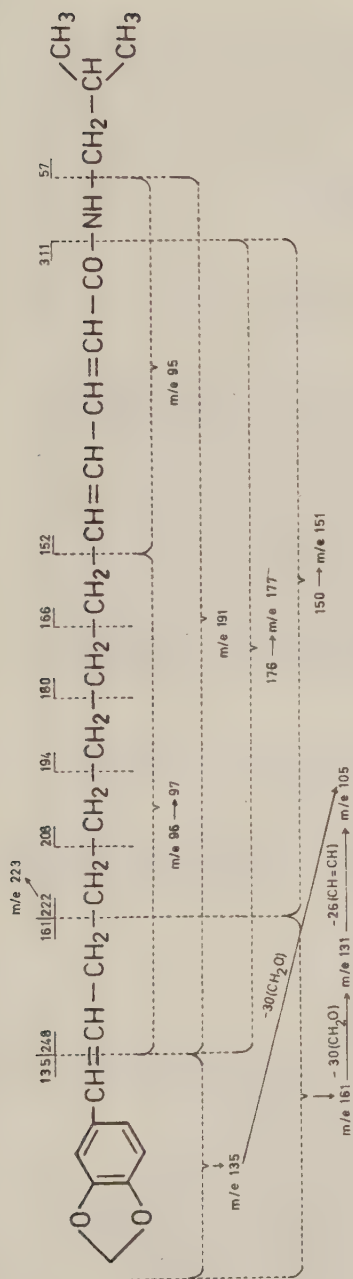


Abb. 16 Zerfallsschema der Substanz 7, $M^+ 383$

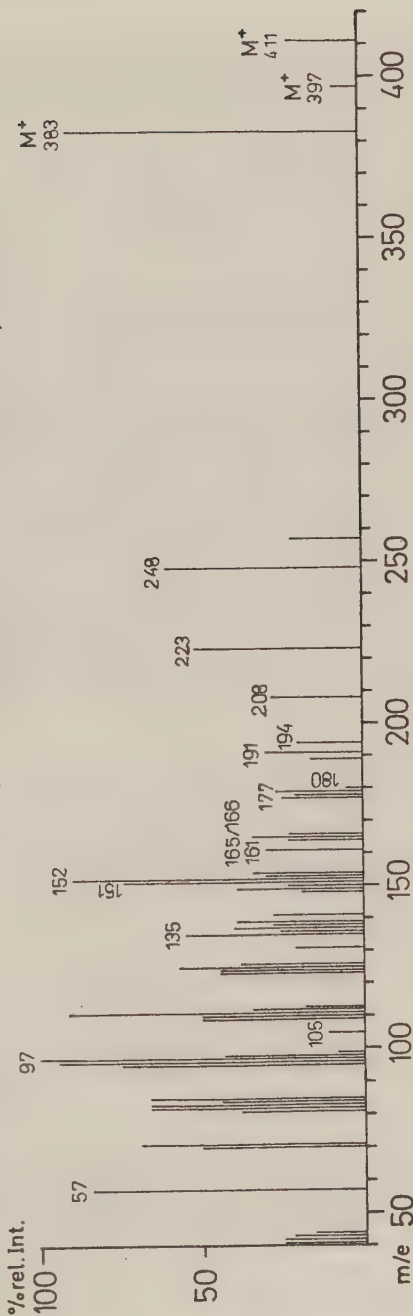
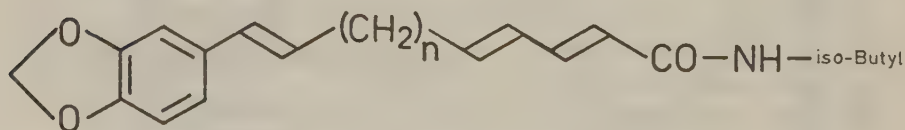


Abb. 17 Massenspektrum der Substanz 7 + höhere Homologe

Einige isolierte Fraktionen von Substanz 7 zeigten ein besonders niedrig liegendes Schmelzpunktsintervall von 95 - 116° C. In ihren Massenspektren war M^+ 383 noch von weiteren Molekülionen mit M^+ 397 und M^+ 411 begleitet. Möglicherweise handelt es sich hierbei um zusätzliche höhere Homologe.

Obwohl die Massenspektren der Substanzen 6, 7 und 8 auf den ersten Blick sehr voneinander abzuweichen schienen - ein für Homologe unerwartetes Ergebnis - waren nach genauerer Analyse der Spektren doch Gemeinsamkeiten in der Fragmentierung zu erkennen, womit sich die Homologie der Substanzen bestätigen ließ. Dieses Verhalten könnte seine Ursache darin haben, daß die beiden ungesättigten Systeme bei den einzelnen Substanzen verschieden weit auseinander lagen und sich aufgrund dessen die elektrostatischen Kraftfelder nicht bei allen Homologen gleichartig beeinflussen konnten. Die dadurch bedingte unterschiedliche Molekülstabilität äußerte sich in einer entsprechend verschiedenartigen Fragmentierung.

Die Massenspektren bestätigten die aufgestellte Strukturformel:



(A) n = 2 (Substanz 6)	M^+ 327	
(B) n = 4 (Substanz 8)	M^+ 355	
(C) n = 6 (Substanz 7)	M^+ 383	
(D) n = 7	M^+ 397	} zusätzliche aus den Massenspektren entdeckte Homologe
(E) n = 8	M^+ 411	

Die chemischen Bezeichnungen dieser Substanzen sind:

N-Isobutyl-9-(Methylenedioxyphenyl)nona-	2,4,8 -trienamid
" -11- "	undeca- 2,4,10- "
" -13- "	trideca- 2,4,12- "
" -14- "	tetradeca-2,4,13- " }
" -15- "	pentadeca-2,4,14- " } s.o.

Da die Substanzen anästhesierend wirken, geben wir ihnen die Trivialnamen:

P i n e r a e s t h i n A, B, C, (D, E).

Ihrem Aufbau nach könnten sie durch gemischte Dimerisierung von Piperin mit aliphatischen, mehrfach ungesättigten Isobutyltrienamiden (z.B. Stoffen nach Art der Substanz 17) und gekreuzte Depolymerisierung entstanden sein (s. auch Substanz 20, S.42).

Nach Abschluß dieser Arbeiten erschienen Veröffentlichungen über die Isolierung einer Verbindung aus Piper guineense (34) und Piper officinarum (46), die mit Substanz 7 ⁺ identisch sein könnte. Joshi und Mitarbeiter (47) beschreiben eine mit Substanz 7 isomere Verbindung, das Piperstachin, mit den Doppelbindungen in 2, 10, 12-Stellung, das sie aus Piper trichostachyon darstellen konnten. Bei einer unreinen Fraktion, der aus Piper guineense erhaltenen Substanz, lag gemäß Massenspektrum ein Hinweis für ein mögliches Homologes mit M^+ 355 vor. Dieses könnte mit Substanz 8 identisch gewesen sein.

Bei Substanz 6 und den aus den Massenspektren entnommenen Homologen mit M^+ 397 und M^+ 411, handelt es sich um Verbindungen, die in der Literatur noch nicht erwähnt wurden.

Über eine lokalanästhesierende Wirkung dieser Stoffgruppe ist bisher in keiner Arbeit berichtet worden.

⁺ Sie wurde von Okogun und Mitarbeitern "Guineensin" genannt (34).

D. Analytische Verfahren zur Identifizierung und Wertbestimmung von Piper nigrum

Nachdem die Kenntnisse über die im Pfeffer vorkommenden Inhaltsstoffe durch die vorliegende Untersuchung vervollständigt werden konnten und die Substanzen nun größtenteils in reiner Form zur Verfügung standen, sollte versucht werden, neue analytische Methoden zur Bewertung des Pfeffers auszuarbeiten.

1. Dünnschichtchromatographische Bestimmung

Für die qualitative Untersuchung wurde zunächst die DC-Methode gewählt. Sowohl die in der Literatur beschriebenen, als auch die im pharmazeutischen Praktikum verwendeten DC-Bestimmungsmethoden beschränkten sich bisher nur auf den Nachweis des Piperins. Da für die Qualitätsbeurteilung und Identitätsprüfung des Pfeffers alle Substanzen, vor allem auch die anästhesierenden Verbindungen, von Bedeutung sind, sollte eine Trennmethode gefunden werden, mit der möglichst das ganze Verbindungsspektrum nachgewiesen werden konnte.

Die Bestimmung wurde mit einem Chloroform-Extrakt durchgeführt. Wir verwendeten das gleiche System, das wir für die Überprüfung der Säulenfraktionen verwendet hatten und entwickelten auf DC-Aluminiumfolien mit Kieselgel GF₂₅₄ und Benzol/Diisopropyläther/Dioxan über eine Wegstrecke von ca. 8 cm. Es war nicht vorteilhaft, über die sonst übliche Weglänge von 15 cm zu chromatographieren, da dann die Flecke zu weit spreiteten und ihre Umrisse und Färbungen nicht mehr so deutlich erkennbar waren. Nach dem oberflächlichen Abdunsten des Lösungsmittels wurde die Platte zunächst im kurz- und langwelligen UV-Licht betrachtet und dann, noch ehe sich das Fließmittel vollständig verflüchtigt hatte, mit konz. Schwefelsäure besprüht.

Die in den Abbildungen 18, 19, 20 und Tabellen 4 und 5 angegebenen Rf-Werte wurden mit frisch vorbereitetem Fließmittel

ohne Kammersättigung erhalten. Chromatographie in mehrere Tage "altem" Fließmittel lieferte niedrigere Rf-Werte.

Das eindeutigste und charakteristischste chromatographische Bild ergab die Detektion im kurzwelligen UV₂₅₄-Licht (Abb. 19). Hier hoben sich 9 - 10 dunkle Flecke infolge Fluoreszenzminderung vom leuchtenden Untergrund ab. Im oberen Bereich der Platte lagen die langkettigen Isobutylsäureamide, darunter liefen die Pfefferlokalanästhetika (=Piperaesthine), dann folgten die Scharfstoffe. Diese drei aus Pfeffer isolierten, chemisch sehr nahe verwandten Säureamidtypen ließen sich also auch im Extrakt noch gut nachweisen.

Zur besseren Orientierung wurden die einzelnen Flecke wie beim Screening-Verfahren (Abb.1 S.8) in zehn Zonen I - X unterteilt.

In der Zone I, Rf 0.85 - 0.9, waren alle langkettigen Isobutyldien- und -triensäureamide vereinigt. In der Zone II, Rf 0.8 - 0.85, fand sich ein Homologes der Piperaesthine (Substanz 7). In Zone III, Rf 0.75 - 0.8, überdeckten sich ein weiteres Homologes der Piperaesthine (Substanz 6) und Substanz 20, wobei letztere vorherrschte. Der Fleck in Zone III zeigte manchmal die Andeutung einer Aufspaltung, wobei der obere Teil der Substanz 6, der unter der Substanz 20 zuzuordnen war. Zu einer Überlagerung mehrerer Scharfstoffe kam es in Zone V, oberhalb Rf 0.6, nämlich von Piperin, Piperanin und Piperettin. In diesem Falle war das Piperin dominierend. Der Scharfstoff Pinerylin lief nur in Höhe der Zone IX, Rf 0.25 - 0.3. Substanz 8, ein drittes Homologes der Piperaesthine, das als Reinsubstanz zwischen Zone II und III liegt, war im Pfefferextrakt nicht ohne weitere Anreicherung nachweisbar. Nicht identifiziert werden konnten der Fleck in Zone IV, Rf 0.7 - 0.75, oberhalb des Piperins, der gelegentlich mit schwacher Fluoreszenzminderung auftretende Fleck zwischen Rf 0.5 -

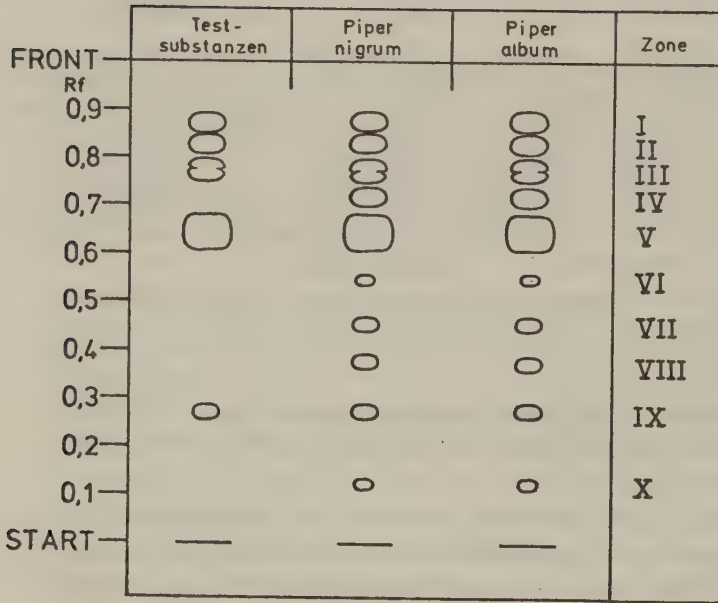


Abb. 18

Detektion im kurzwelligigen UV-Licht (254 nm)

Tabelle 4:

Rf	Zone	Substanzen
0.85-0.9	I	langkettige Dien- und Trien-Isobutylsäureamide
0.8 -0.85	II	Piperaesthin C (Substanz 7) ⁺
0.75-0.8	III	oberer Teil: Piperaesthin A (Subst.6) ⁺ unterer Teil: cis-trans-Isomere des Piperins + Dipiperin (Substanz 20)
0.6 -0.7	V	Piperin, Piperanin, Piperettin
0.25-0.3	IX	Piperylin

⁺s.S. 53 u.49.

0.6 (= VI), zwei weitere, mit Piperilin etwa gleich starke Flecke im Rf-Bereich von 0.35 - 0.5 (= VII und VIII) und der unmittelbar oberhalb Rf 0.1 schwach zu erkennende Fleck X.

Befanden sich oberhalb der Zone I noch Flecke, so deutete dies auf Zersetzungsprodukte des Pfeffers hin, denn sie wurden niemals im frischen, sondern nur in Extrakten aus längerer Zeit gelagertem Pfeffer beobachtet.

Die Unterscheidung zwischen Piper nigrum und Piper album ist nur im UV₃₆₆ möglich (Abb. 19). Hier sind mindestens 8 (weißer Pfeffer) bzw. 12 (schwarzer Pfeffer) fluoreszierende Flecke erkennbar, die über den ganzen Rf-Bereich verteilt sind. Im Rf-Bereich von 0 - 0.15 sind rosa, rote und lila Fluoreszenzen sichtbar, die durch Chlorophyll verursacht werden. Es stammt bei Piper nigrum aus der Fruchtschale und fehlt bei Piper album. Im Rf-Bereich von 0.25 - 0.3 (= IX) tritt besonders die fahlblaue Fluoreszenz des Piperylins in Erscheinung. Darunter liegt beim schwarzen Pfeffer eine schwach hellblaue Fluoreszenz, die beim weißen Pfeffer fehlt. Oberhalb des Piperylins, Rf 0.3 - 0.45, folgen eine gelbliche, weißliche (= VIII) und schwach türkisfarbene (= VII) Fluoreszenz. Dominierend im Chromatogramm ist der stahlblau fluoreszierende Fleck des Piperins zwischen 0.6 und 0.7. Im Rf-Bereich 0.7 - 0.8 liegen zwei weitere kräftig gelbe Fluoreszenzen. Die obere der beiden überdeckt die stahlblaue Eigenfluoreszenz der Substanz 20. Unterhalb Rf 0.9 ist die hellblaue Fluoreszenz der langkettigen Isobutyltrienamide (Substanz 13 und 17) erkennbar.

Durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure (Abb. 20) werden einige Zonen selbst angefärbt. Piperilin (= IX) färbt sich schwach gelb. Der deutlich gelbe Pinerinfleck hat ein besonders intensiv gefärbtes Zentrum. Auch der Bereich über dem Pinerin wird selbst angefärbt und besonders stark der obere Teil (= III, Substanz 20). Die beiden, im UV₂₅₄ erkennbaren, oberen Zonen I und II bleiben farblos.

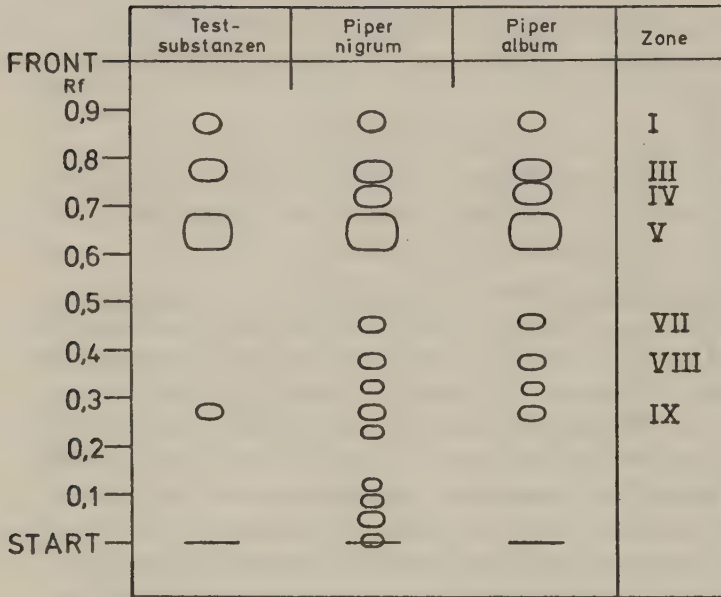


Abb. 19

Detektion im langwelligen UV-Licht (366 nm)

Tabelle 5:

Rf	Farbe	Zone	Substanzen
0.85-0.9	hellblau	I	langkettige Isobutyltrienamide (= Substanz 13 und 17)
0.75-0.8	gelb	III	unbekannt, überdeckt Substanz 20
0.7 -0.75	gelb	IV	unbekannt
0.6 -0.7	stahlblau	V	Piperin
0.45	schwach türkis	VII	unbekannt
0.35-0.4	weißlich	VIII	unbekannt
0.3 -0.35	gelblich	-	unbekannt
0.25-0.3	stahlblau	IX	Piperylin
0.2 -0.25	hellblau		unbekannt
0.0 -0.15	drei Flek- ke: lila, rot, rosa		Chlorophyll

} fehlt in Piper
album

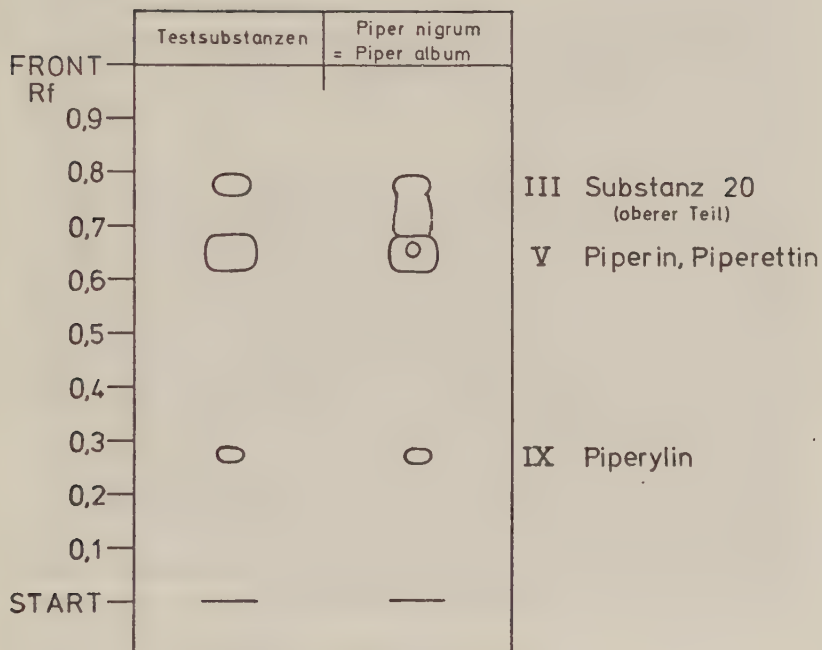


Abb. 20

Detektion mit konz. Schwefelsäure

Alle Flecke sind gelb.

Der Fleck unterhalb Rf 0.3 ist schwach gelb (= Piperylin).

Der Fleck zwischen Rf 0.6 und 0.7 hat eine besonders intensiv gefärbte Mitte (= Piperin, Piperettin).

Rf 0.75-0.8 (= Substanz 20).

Interessant war, daß Piperin immer mit etwas Substanz 20 vergesellschaftet vorkam. Selbst reinstes, durch mehrmaliges Umkristallisieren gewonnenes Piperin hatte auf dem Dünnschichtchromatogramm einen begleitenden Fleck in Höhe der Zone III. Ließ man die Piperinlösung längere Zeit am Licht stehen, so veränderte sich das Verhältnis der Fleckengröße zu gunsten der Substanz 20.

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit die Isolierung und Strukturaufklärung der Substanz 20 gelungen war und sich herausgestellt hatte, daß der Fleck in Zone III mit den cis-trans-Isomeren des Piperins nebst über 20 % Dipiperin identisch ist, ist nunmehr auch bewiesen, daß bei Lichteinwirkung neben der einfachen cis-trans-Isomerisierung in verstärktem Maße das Dimerprodukt entsteht. Da von uns festgestellt worden war (s.S.68), daß Substanz 20 wesentlich weniger scharf schmeckt als trans-trans-Piperin, ist mit einem erhöhten cis-trans-Isomeren- und Dipiperingehalt eine Erniedrigung des Schärfegrades und damit eine Wertminderung des Pfeffers verbunden. Für die Bewertung des Pfeffers ist aber der Scharfwert maßgebend.

2. Geschromatographische quantitative Bestimmung der Pfeffer-scharfstoffe

Obwohl man bei Scharfstoffdrogen ähnlich wie bei Bitterstoffdrogen über eine organoleptische oder sensorische Grenzwertbestimmung eine ungefähre Qualitätsbestimmung durchführen kann, genügen diese heute nicht mehr den Anforderungen der modernen Drogenanalytik. Bekanntlich können die Geschmacksemfindungen durch Begleitstoffe in der Droge teilweise aufgehoben oder gestört werden. Hinzu kommt, daß der individuelle Schwellenwert von Mensch zu Mensch großen Schwankungen unterworfen sein kann. Deshalb ist die Tendenz verständlich, auch für Scharfstoffe eine chemische oder andere geschmacksunabhängige Wertbestimmungsmethode zur Verfügung zu haben.

Aus der Literatur sind für den Pfeffer eine Reihe von Bestimmungsmethoden bekannt.

Eine nur orientierende Methode ist die Stickstoffbestimmung nach Kjehldahl. Hierbei werden außer dem Piperin alle anderen Stickstoffsubstanzen, wie z.B. die Isobutylamide, miterfaßt (48, 49).

Genauer sind spektralphotometrische Methoden, bei denen das zumeist nach vorheriger Extraktion aus Pfeffer isolierte Piperin entweder durch direkte Messung im UV (50, 51, 52) oder nach einer Farbreaktion kolorimetrisch erfaßt wird. So wurden Verfahren mit Chromotropsäure (52), die Komarowski-Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd (53), die Umsetzung mit Salpetersäure (54), mit 85 %iger Phosphorsäure und anschließendem Erhitzen (55) oder die Bildung eines Kupfer-Piperidinpentamethylendithiocarbamats nach vorausgegangener alkalischer Hydrolyse (56) vorgeschlagen. Auf die Bestimmung des, bei der Hydrolyse freigesetzten Piperidins, läuft ein titrimetrisches Verfahren hinaus (45). Kürzlich wurde außerdem eine dünnschichtchromatographische Methode empfohlen (57). Dabei wird nach der DC-Trennung die Fleckengröße des Piperins mit der Fläche eines Piperinstandards verglichen.

Alle genannten Methoden sind jedoch sehr umständlich, zeitraubend und nicht für Piperin und die anderen Scharfstoffe spezifisch. Schließlich war zu prüfen, ob nicht auch die anästhesierenden Verbindungen für eine Wertbestimmung des Pfeffers herangezogen werden müssen.

Obwohl Scharfstoffe schon gaschromatographisch bestimmt wurden, wie z.B. die Capsaicine (58, 59) oder die Gingerole und ähnliche Substanzen (60), ist außer der GC-Analyse des Piperins als Reinsubstanz (61) noch keine gaschromatographische Untersuchung der Pfefferscharfstoffe aus Pfeffer bekannt.

Gaschromatographische Voruntersuchungen mit der stationären Phase UCCW 982 (62) bei kontinuierlich programmierter Temperatur von 200 - 260° C brachten die besten Trennungen. Als Testsubstanz wurde ein handelsübliches trans-trans-Piperin eingesetzt. Bei der gaschromatographischen Untersuchung zeigte sich, daß dieses Präparat nur zu 97 % rein war. Die Verunreinigung bestand in einem zweiten Peak mit kürzerer Retentionszeit (Rt 1.75) als Piperin (Rt 2.10) (s. Abb.21).

Auch das reinste, selbst isolierte Piperin, das in allen Daten wie Schmelzpunkt, molarer Extinktion, UV- und IR-Spektrum mit den Literaturwerten übereinstimmte, zeigte noch einen Anteil von rund 1 % Verunreinigung. Diese waren zunächst ausschließlich für das cis-trans und trans-cis-Isomerengemisch des Piperins gehalten worden (63). Im Verlauf der Arbeit stellte sich jedoch heraus, daß dieser Peak zusätzlich noch Dipiperin enthalten mußte. Als innerer Standard wurde Arachinsäuremethylester gewählt.

Bei der Bestimmung des Korrekturfaktors

$$f_{\text{tr.-tr.-Piperin}} = \frac{mg_{\text{Standard}} \times \text{Flächeneinheiten}_{\text{Piperin}}}{mg_{\text{Piperin}} \times \text{Flächeneinheiten}_{\text{Standard}}}$$

ergab sich ein Mittelwert von 0.73. Durch diesen Faktor muß die Piperinfläche der Pfefferchromatogramme dividiert werden, um die Piperinmenge in Gew. % zu erhalten.

Pfeffer wurde als Ganzdroge und frisch gemahlen mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Wie aus der Tabelle 6 hervorgeht, läßt sich das Piperin nur quantitativ extrahieren, wenn die gepulverte Droge verwendet wird:

Tabelle 6:

Droge	Ausgangsform	%-Gehalt trans-trans- Piperin
Frct.Piperis nigri	ganze Frucht	2,36
	frisch gemahlen	3,02
Frct.Piperis albi	ganze Frucht	2,48
	frisch gemahlen	3,30

Von den verwendeten Extraktionsmitteln erhält man mit Dichlormethan die höchsten %-Ausbeuten:

Tabelle 7:

	Lösungsmittel	Extrahierbare Menge Piperin (mg/g Droge)
	Cyclohexan	6,1 mg
	Chloroform	40,5 mg
	Dichlormethan	43,5 mg
	Äthanol abs.	41,5 mg

Die zur quantitativen GC-Analyse verwendeten Pfefferextrakte von *Piper nigrum* und *Piper album* wurden durch Extrahieren der gemahlenden Früchte mit einer definierten Menge Standardlösung (Dichlormethan + innerer Standard) gewonnen. Die Rohextrakte wurden filtriert und dann aliquote Teile in den Gaschromatographen injiziert.

Durch Überspritzen mit Testsubstanzen wurden die Peaks zugeordnet, Abb. 21 und Tabelle 8:

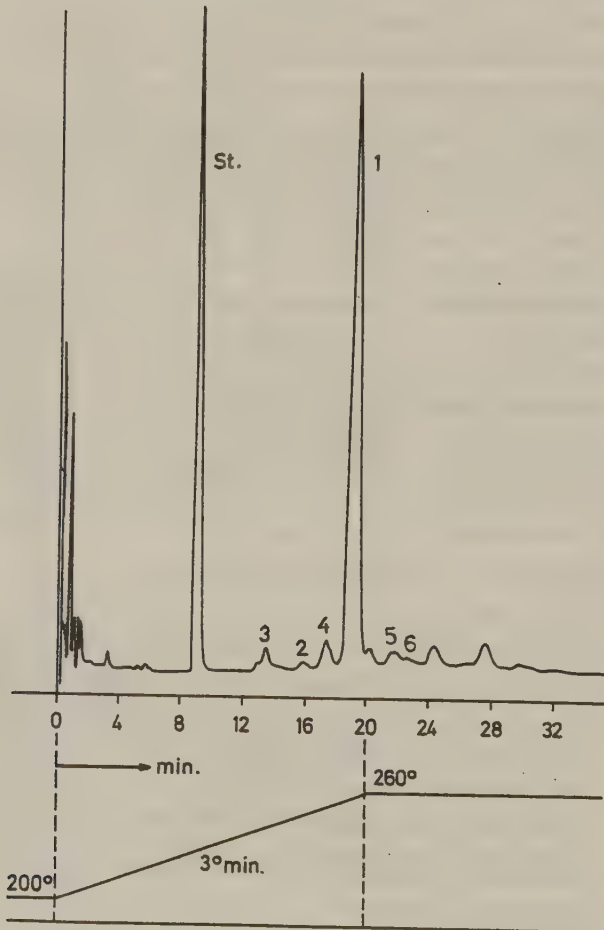


Abb. 21

Gaschromatogramm der Analysenlösung Fruct. Piperis nigri pulvis

Tabelle 8:

Peak-Nr.	Substanz	Gesamtretention	rel.Ret.Zeit
St.:	Standardsubstanz	ca. 9 Minuten	-
1 :	trans-trans-Piperin	ca. 19 Minuten	2.10
2 :	Substanz 20	ca. 16 Minuten	1.75
3 :	Piperanin	ca. 13 Minuten	1.45
4 :	Piperylin + Substanz 7+8 + aliphatische Dien- und Trienamide	ca. 17 Minuten	1.90
5 :	Piperettin	ca. 22 Minuten	2.45
6 :	Substanz 6	ca. 23 Minuten	2.55

Wie aus dem Chromatogramm zu ersehen ist, dominiert der trans-trans-Piperinpeak (Peak 1). Die anderen Peaks (Nr.2-6) sind mengenmäßig von untergeordneter Bedeutung, doch wurde zum Vergleich auch der Anteil an Substanz 20 (cis-trans-Isomeren des Piperins + Dipiperin) (Peak 2) und Piperanin (Peak 3) bestimmt. Da die Substanzen chemisch sehr ähnlich sind, kann man davon ausgehen, daß sie im Detektor annähernd die gleiche Ansprechempfindlichkeit haben. Wir haben daher zur Berechnung denselben Korrekturfaktor verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9:

Droge	% Gehalt Gaschromatographie		
	trans-trans-Piperin	Substanz 20	Piperanin
Frct.Piper nigr. tot.	3,02	0,02	0,08
Frct.Piper albi tot.	3,30	0,08	0,10
Frct.Piper nigr. pulv.	5,02	0,05	0,00

Der trans-trans-Piperinegehalt der im Handel erhältlichen Ganzdrogen war mit 3,0 bzw 3,3 % relativ niedrig. Der gepulverte Pfeffer des Handels hatte einen bedeutend höheren Gehalt an trans-trans-Piperin. Insgesamt lagen die Werte tiefer, als die in der Literatur angegebenen (2,64). Danach enthält schwarzer Pfeffer durchschnittlich 6-8 % und weißer Pfeffer 6,6 - 7,6 % Piperin. Dies dürfte auf die bisher verwendeten Bestimmungsmethoden zurückzuführen sein, mit denen noch andere, nicht scharfe Verbindungen miterfaßt wurden.

Zur Ergänzung wurde auch grüner Pfeffer, der in einer Salzlake eingelegt war, untersucht. In diesem Pfeffer konnten 0,28 % trans-trans-Piperin nachgewiesen werden. Der Hauptanteil des Piperins befand sich in der Lake. Aus dieser Untersuchung geht außerdem hervor, daß geringe Anteile der cis-trans-Isomeren des Piperins und des Dimeren bereits von Anfang an in der Droge enthalten sein müssen.

Die gaschromatographische Methode gibt somit die Möglichkeit, selektiv das trans-trans-Piperin, den wertbestimmenden Scharfstoff von Piper nigrum und Piper album, schnell und sicher quantitativ zu ermitteln.

Alle übrigen Scharfstoffe (Piperylin, Piperanin, Piperettin, Dipiperin und die cis-trans-Isomeren des Piperins) können bei der Scharfwertbestimmung vernachlässigt werden. Ihre Prozentwerte liegen bei frischem und 1-2 Jahre gelagertem Pfeffer unter 0,1 %. Hinzu kommt, daß diese Begleitstoffe in der Geschmacksintensität mit Ausnahme des Piperylins (29) weit unter der des Piperins liegen:

Tabelle 10:

Scharfstoff	rel.Schärfe
Piperin (trans-trans)	++++++
Piperylin	++++++
Piperanin	+++
Substanz 20	++(+)
Piperettin	+

Wie wir feststellen konnten (Chromatogramm Peak 4 und 6) ist auch der Anteil der anästhesierenden Stoffe mit 0,01 % an der Geschmacksbildung so gering, daß eine Bestimmung ohne Bedeutung ist.

E. Diskussion

1. Lokalanästhetika und Scharfstoffe

1.1. Pfefferlokanästhetika

Über das Vorkommen von anästhetisch wirkenden Verbindungen in Piper nigrum ist bisher nicht berichtet worden. Während die langkettigen Isobutyltrienamide (Substanz 17) nur eine leicht anästhesierende Empfindung hervorriefen, war diese Wirkung bei den Methylendioxyphenyl-Isobutyltrienamiden (Substanz 6, 7 und 8) besonders ausgeprägt. Auf die Zunge gebracht, erzeugten sie eine starke Anästhesie, die etwa 3 - 5 Stunden anhielt.

Eine detaillierte quantitative Bestimmung am Kaninchenauge war aus Substanzmangel nicht möglich. Deshalb wurde eine sensorische Prüfung durchgeführt. Dazu wurden von den einzelnen Substanzen gesättigte alkoholische Lösungen hergestellt und davon etwa 10-15 μ l mit einem Schmelzpunktsröhrchen auf die Zunge getupft.

Substanz 6 reagierte sofort stark anästhesierend. Die Wirkung war auch nach einer Stunde noch gut wahrzunehmen, wenngleich schon merklich schwächer. Nach zwei Stunden war noch ein leicht kühlender Effekt spürbar, der sich bis zum Ende der dritten Stunde hin erstreckte und sich nach ca. 3 1/2 Stunden gänzlich verlor.

Bei Substanz 8 setzte die Wirkung zwar auch gleich ein, erreichte ihre volle Stärke jedoch erst nach 4 - 5 Minuten. Die Reaktion war bis zu 1 1/2 Stunden noch voll zu spüren und ließ dann langsam nach. Nach 3 1/2 bis 4 Stunden war sie verschwunden, wobei man in der letzten Stunde noch einen schwachen Erfrischungseffekt empfand.

Substanz 7 fing nach 7 Minuten an, schwach zu anästhesieren, und erreichte ihre volle Wirkung nach 10 bis 12 Minuten. Die intensive Reaktion hielt 1 1/2 bis 2 Stunden an

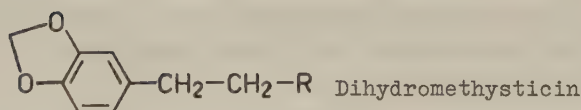
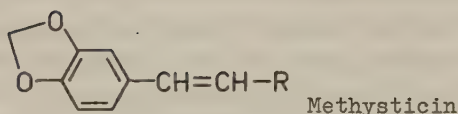
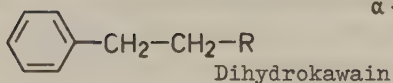
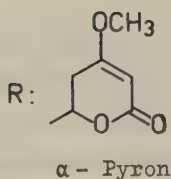
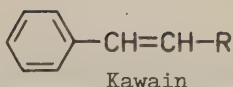
und schwächte sich dann allmählich ab. Die Wirkung war sogar nach 5 1/2 Stunden immer noch schwach wahrnehmbar.

Unter den gleichen Bedingungen haben wir gesättigte alkoholische Lösungen von Kawain und Methysticin, die als anästhetisch wirksam bekannt sind, getestet. In beiden Fällen war nur andeutungsweise eine Anästhesie feststellbar. Kawain aber soll die gleiche Wirkungsstärke wie das Cocain haben (65).

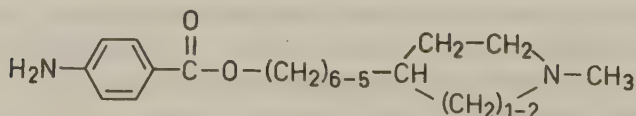
Daraus geht hervor, daß die anästhetische Wirkung der Substanzen 6, 7 und 8, die sich untereinander lediglich in Wirkungsseintritt und -dauer unterscheiden, mindestens in der Größenordnung von Cocain liegt. Der anästhesierende Effekt wird beim Pfeffer wahrscheinlich nur deshalb wenig oder kaum bemerkt, da er von dem dominierenden Scharfgeschmack überdeckt wird. Nach unseren Untersuchungen sind die Pfefferlokalanästhetika in einer Konzentration von nur 0,001 bis 0,01 % im Pfeffer enthalten.

1.2. Lokalanästhetische Substanzen anderer Pfefferarten und Pflanzenfamilien

Die lokalanästhetische Wirkung ist zwar für Piper nigrum noch nicht beschrieben, in der Pfefferfamilie aber nicht unbekannt. Aus Piper methysticum, dem Rauschpfeffer, konnten z.B. die sog. Kawa-Pyrone isoliert werden, von denen insbesondere Kawain, Dihydrokawain, Methysticin und Dihydromethysticin deutlich anästhetische Wirksamkeit zeigen. Der Wirkungsgrad nimmt in der angegebenen Reihenfolge ab (65). Bekanntlich beschränkt sich die Pharmakologie der Kawa-Pyrone nicht auf die Lokalanästhesie, sondern schließt noch eine sedative, analgetische, spasmolytische, antikonvulsive, antifibrillatorische und fungistatische Wirkung mit ein (65-71). Diese Eigenschaft haben sie mit vielen anderen lokalanästhetisch wirksamen Naturstoffen und Syntheseprodukten gemeinsam (s. Tabelle 11 und 12). Kawanyrone sind 4-Methoxy- α -Pyrone, die über eine gesättigte bzw. ungesättigte, zweigliedrige Kohlenstoffbrücke mit einem Phenyl- oder Methylendioxyphenylrest verbunden sind.



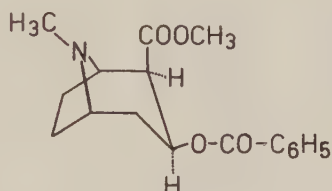
Auch Piper jaborandi und Piper ovatum sollen lokalanästhesierende Stoffe enthalten. In beiden Fällen soll es sich um cyclische Stickstoffbasen handeln. Das lokalanästhetische Prinzip von Piper jaborandi soll das bitterschmeckende Jaborandin, mit einer zehnfach stärkeren Wirkung als das Procain, sein (72). Nach Wiesner (73) handelt es sich um einen p-Aminobenzoesäureester eines Aminoalkohols mit der Summenformel $C_{18}H_{28-30}O_2N_2$:



Aus Piper ovatum wurde eine lokalanästhetische Substanz, $C_{16}H_{21}NO_2$, isoliert, aus der bei der Hydrolyse - gleich dem Piperin - eine Säure und eine Piperidin-Base freigesetzt wird (74, 75).

Aus einigen anderen Piperarten konnte, als schwach anästhetisch wirksame Verbindung, das N-Isobutyl-deca-trans-2-trans-4-dienamid ermittelt werden (32, 76-79) (s. Tabelle 11).

Die erste Verbindung mit starker lokalanästhetischer Wirkung, die aus einer Pflanze in reiner Form isoliert wurde, dürfte das Cocain aus *Erythroxylum coca* gewesen sein (80).



Cocain gilt als Standard der Lokalanästhetika. An ihm haben sich alle Neuentwicklungen in bezug auf Molekularstruktur und Wirkungsgrad, der mit 1 festgelegt wurde, orientiert.

Weitere Pflanzenfamilien mit anästhesierenden Inhaltsstoffen sind in der Tabelle 12 zusammengestellt:

Tabelle 11:

Lokalanästhetische Substanzen bei Piperaceen

Pflanzenfamilie	Pflanzenname o. Droge	isolierte Verbindung	Lokalanästhetische Wirksamkeit	Sonstige Wirkungen Verwendungszweck
Piperaceen	Piper methysticum (65-71)	Kawa-Pyrone	Kawain = Cocain	sedativ (67) analgetisch (66) spasmolytisch (68) antikonvulsiv (69) antifibrillatorisch (70)
"	Piper jaborandi (73, 72)	p-Aminobenzoessäure- ester (79)	10 x Procain (72)	fungistatisch (71) schweißstreibend speichelflußför- dernd
"	Piper ovatum (74, 75)	Piperin-ähnlich	mit Pellitorin vergleichbar	strychnin-ähnlich speichelflußför- dernd
"	Piper longum (32)	Isobutyldecadienamid	schwach	antibakteriell antispasmolytisch speichelflußför- dernd
"	Piper peepuloides (32)	"		antituberculös (79)
"	Piper novae- hollandiae (76, 79)	"		anticarcinös (76)
"	Piper sylvaticum (77)	"		
"	Piper nepalense (78)	"		

Tabelle 12:

Lokalanästhetische Substanzen anderer Pflanzenfamilien

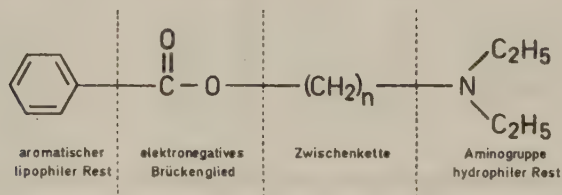
Pflanzenfamilie	Pflanzennamen o. Droge	isolierte Verbindung	lokalanästhetische Wirksamkeit	Sonstige Wirkungen Verwendungszweck
Erythroxylaceen	Erythroxyla coca (80)	Cocain	Standard = 1	suchterregend
Laminaceen	Kentha-arten (80)	Menthol	schwach	kühlend
Ephedraceen	Ephedra-arten (80)	Ephedrin	schwach	gefäßverengend zentralerregend Kreislaufmittel
Myrtaceen	Jambosa caryophyllus (80)	Eugenol	schwach	ätzend
"	Pimenta officinalis (80)	"		desinfizierend
Salicaceen	Cortex salicis (80)	Saligenin	stark	antipyretisch blutdrucksenkend
Apocynaceen	Rauwolfia-Arten (80)	Yohimbin	stark	blutdrucksenkend Aphrodisiacum
Rubiaceen	Cortex yohimbe (80)	"		
"	Cortex China (80)	Chinin	stark	Malaria-mittel analgetisch
Ranunculaceen	Aconitum napellus (80)	Aconitin	stark	antipyretisch antiarrhythmisch
Caesalpinaceen	Erythrophleum (80)	Cassain und Goumingin	stark	antineuralgisch antirheumatisch
"	" ruineense	"	stark	zentral und peripher erregend
"	" coumunga	"	stark	herzwirksam herzwirksam

Die Aufstellung zeigt, daß die lokalanästhetische Wirkung sehr häufig mit einer Herz- und Kreislaufwirkung kombiniert ist.

Aufgrund dieser Erkenntnisse lassen auch die Pfefferlokalanästhetika mit hoher Wahrscheinlichkeit zusätzliche Wirkungen vermuten, besonders nachdem in der Literatur über die Verwendung des Pfeffers als Antineuralgikum, Stimulans und Insektizid berichtet wird.

1.3. Struktur-Wirkprinzip der Pfefferlokanästhetika

Ausgehend vom Cocain wurden die synthetischen Anästhetika (81), Anästhesin, Procain, Nupercain, Xyclocain = Lidocain, usw., entwickelt. Für die bisher bekannten Lokalanästhetika ist ein aromatischer, lipophiler Rest, ein elektrophiles Brückenglied mit einer Zwischenkette und ein hydrophiler Rest, der gewöhnlich von einer Amingruppe gebildet wird, charakteristisch (82).



Dem negativen Brückenglied kommt eine zentrale Rolle im Wirkungsmechanismus zu. Das negative Brückenglied braucht dabei nicht unbedingt eine Estergruppe zu sein. Der Grad der Elektronegativität bzw. die damit verbundene Dipolstärke läßt Parallelen zur Wirkungsintensität erkennen (83).

Damit sich ein genügend großes Dipolmoment ausbilden kann, müssen induktiv-mesomere Effekte wirksam werden können. Diese Funktion übt bei den gebräuchlichen Lokalanästhetika der in Konjugation stehende aromatische Rest aus. Sie kann auch von funktionellen Gruppen mit aromatischem Charakter, z.B. Vinylgruppen, übernommen werden (84).

Die Bedeutung des aromatischen Restes besteht ferner darin, unter Beteiligung Van der Waalscher Kräfte zur Bindungsfestigkeit am Rezeptor beizutragen (85) und für eine genügend große Lipophilität der Substanzen zu sorgen.

Der Aminfunktion werden spezielle wechselseitige hydrophile und lipophile, für die Moleküle wichtige Lösungseigenschaften zugesprochen (86).

Die Funktion der Zwischenkette wird bei den Lokalanästhetika darin gesehen, daß sie den Molekülen eine große Flexibilität verleiht (87).

Die Pfefferlokanästhetika haben anstelle der Estergruppe eine Amidfunktion. Hier kann der Dipolcharakter der Carbonylgruppe, d.h. des negativen Brückengliedes, durch das angekoppelte Diensystem nach Art der gebräuchlichen Lokalanästhetika verstärkt werden.

Zur notwendigen Bindungsfestigkeit und Lipophilität können bei den Pfefferlokanästhetika zwei, bei den einzelnen Homologen durch eine unterschiedlich lange aliphatische Kette voneinander getrennte, ungesättigte Systeme beitragen: einmal das Diensystem, zum anderen der Styrolrest.

Aminfunktion und Zwischenkette der gebräuchlichen Lokalanästhetika werden bei den Pfefferlokanästhetika durch den Isobutylrest verkörpert. Hier ersetzt das tertiäre Kohlenstoffatom den tertiären Aminstickstoff im Sinne einer isosteren Gruppe (88). Da die Aminfunktion für die eigentliche lokalanästhetische Wirkung nicht erforderlich zu sein scheint (89), ist der Austausch für die spezifische Wirkung der Pfefferlokanästhetika sichtlich ohne Bedeutung.

Die Aufgabe der Zwischenkette können bei den Pfefferlokanästhetika zwei Kettensysteme übernehmen, und zwar das Methylenglied der Isobutylgruppe und die Zwischenkette, die die beiden ungesättigten Systeme trennt.

Die Pfefferlokanästhetika unterscheiden sich damit von den gebräuchlichen Lokalanästhetika im wesentlichen dadurch, daß

sie über eine höhere molekulare "Flexibilität" und insgesamt über ein größeres ungesättigtes System verfügen. Dies ermöglicht wahrscheinlich eine verstärkte Bindung an den Rezeptor. Hiermit ließe sich der hohe Grad der Wirkungsstärke und die besonders lange Wirkdauer der Pfefferlokanästhetika, zwischen 3 - 5 Stunden, erklären. Die vergleichbare Zeit für Cocain beträgt ca. 30 - 40 Minuten (90).

Interessant ist außerdem, daß in der Reihe der Pfefferlokanästhetika eine unterschiedlich lange, zwischen die beiden ungesättigten Systeme eingeschobene Kette, Unterschiede im Wirkungseintritt (0-7 Min.), im Erreichen der vollen Wirkstärke und - besonders auffällig - in der Wirkdauer (s.o.) hervorruft.

1.4. Scharfstoffe

Tabelle 13 S.80 und Abb. 22 S. 81

Die wichtigsten Scharfstoffe lassen sich in vier Haupttypen unterteilen:

1. Säureamid-Scharfstoffe
2. o-Methoxyphenol-Scharfstoffe
3. Senföle
4. scharfschmeckende Sulfide.

Zum ersten Typ gehören außer den Pfefferscharfstoffen (Strukturformeln S.30) die Isobutylamidscharfstoffe, die aus Asteraceen und Rutaceen isoliert wurden (91-100), die synthetischen Monomethylamide (101) und das Capsaicin, ein Solanaceenscharfstoff.

Die Säureamid-Scharfstoffe unterscheiden sich nicht so sehr in der Säure-, aber durchweg in der Aminkomponente:

Säurekomponente		Aminkomponente
Aromat + aliphatische Kette (ungesättigt o.teilgesättigt)	- CO -	Piperidin o.Pyrrolidin
aliphatische Kette (teil-ungesättigt)	- CO -	Isobutylamin
aliphatische Kette (gesättigt)	- CO -	Monomethylamin
aliphatische Kette (gesättigt o. teil-ungesättigt)	- CO -	Vanillylamin

Strukturell fallen die Pfefferscharfstoffe insofern aus dem Rahmen, als die Kette endständig einen Aromaten und die Amidgruppe ein tertiäres, cyclisch gebundenes Stickstoff enthält.

Die Struktur des Kettengliedes selbst ist für den Schärfe-grad entscheidend (102, 103). Sowohl Hydrierung einer Doppelbindung (Piperanin), Verlängerung der Kette um eine weitere Doppelbindung (Piperettin), als auch Isomerisierung (29) und der Einbau zweier Kettenglieder in einen Cyclobutanring unter Aufhebung einer Doppelbindung infolge Dimerisierung (Dipiperin) führen zur Verminderung der Scharfwirkung. Der Austausch eines Piperidinrings gegen einen Pyrrolidinring (Piperylin) hat dagegen keinen Einfluß (29).

Ein zweiter Scharfstofftyp hat als charakteristisches Bauelement ein o-Methoxyphenol. Eugenol und die Gingerole von Zingiberaceen sind die entsprechenden Beispiele.

Den dritten Scharfstofftyp bilden die Senföle, Derivate der Isothiocyanate. Sie kommen bevorzugt in Brassicaceen vor. Ihr bekanntester Vertreter ist das Sinigrin (→ Allylsenf-öl), das auch im Pfeffer aufgefunden worden sein soll (104).

Den vierten Scharfstofftyp stellen die sulfidartigen Allium-scharfstoffe, insbesondere das Allicin, dar.

Nicht streng in diese Typisierung paßt das noch erwähnenswerte Tadeonal, ein Scharfstoff des als Pfefferersatz verwendeten Wasserpfeffers, Polygonum hydropiper (105).

Aus den Formelbildern (Tabelle 13 und Abb. 22) ist ersichtlich, daß die Scharfstoffe, mit Ausnahme der Monomethylamide, durchweg zwei Zentren mit beweglichen Elektronen enthalten. Während das eine eine Amid-, Keton-, Aldehyd-, Allyl- oder Rhodanidfunktion sein kann, besteht das andere gewöhnlich aus einem aromatischen oder vinylischen System. Alle zuerst genannten Gruppen können eine polarisierte Bindung ausbilden, die aufgrund von Dipolkräften eine feste Adsorption an einen hypothetischen Rezeptor ermöglicht, während die

Tabelle 13:

Zusammenstellung der anästhetisch und insektizid wirksamen Isobutylamidscharfstoffe

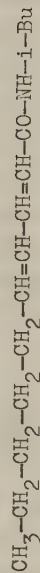
octa-Verbindungen: (91, 92)

nicht scharf,
nur schwach insektizid



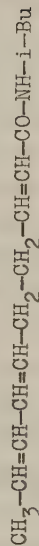
deca-Verbindungen:

Pellitorin-Hauptprodukt
schwach wirksam (93)



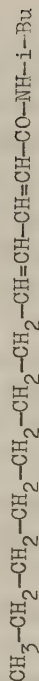
A'finin = Spilanthol (94, 95, 96)

brennend scharf
insektizid wie Pyrethrin

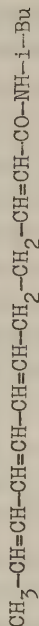


dodeca-Verbindungen:

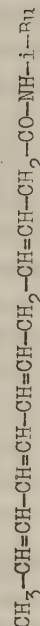
C₁₂-Homologe des Pellitorins
unwirksam (93)



Neoherculin, wahrscheinlich
identisch mit Sanshoöl I
scharf, insektizid (97, 98)

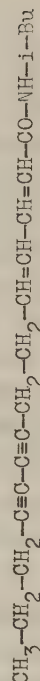


Sanshoöl II (mutmaßlich) (98)



Tetra-deca-Verbindung:

Anacyclin (93)
scharf, stark wirksam



Octadeca-Verbindungen:

Scabrin (99)
intensiv brennend u. paralyisierend
auf der Zunge, stark insektizid

C₁₈-Säureamid mit 5 Doppelbindungen

Heliopsin (100)

C₁₈-Säureamid mit 6 Doppelbindungen

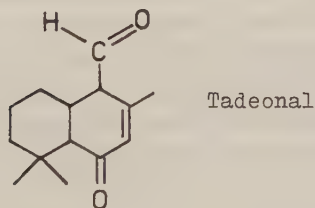
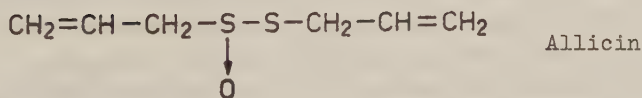
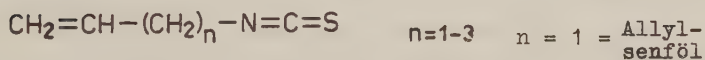
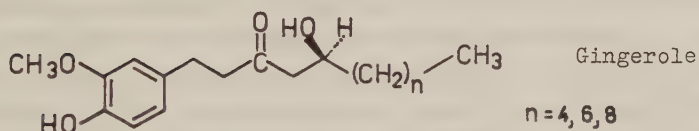
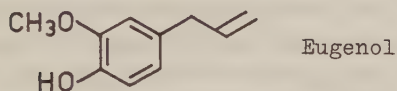
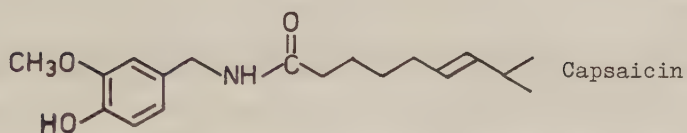
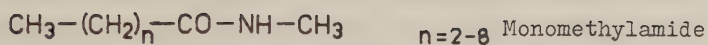


Abb. 22

andere Doppelbindungsfunktion zur Bindungsfestigkeit an den Rezeptor beitragen kann. Dabei ist die Entfernung beider ungesättigten Systeme offensichtlich von Bedeutung, denn sie liegt, typabhängig, optimal bei ein bis vier Zwischengliedern.

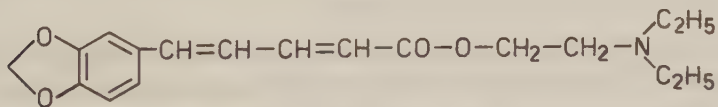
1.5. Beziehungen zwischen Schärfe und Lokalanästhesie bei Pfeffersubstanzen

Ein Vergleich der scharfschmeckenden und lokalanästhesierenden Verbindungen des Pfeffers läßt erkennen, daß sie beide Säureamide darstellen, wobei offenbar dem Aminbaustein eine zentrale Rolle hinsichtlich der Wirkqualität zukommt. Ist er tertiär und cyclisch, so tritt lediglich ein scharfer Geschmack auf, ist er sekundär, so tritt eine lokalanästhetische Wirkung zutage, die je nach Art der Säurekomponente noch mit einem anderen Geschmack gepaart sein kann. Ein gemischt aromatisch-aliphatischer Diensäureteil bringt eine intensive, rein lokalanästhetische Wirkung hervor. Langkettige Isobutyldiensäureamide dagegen sind völlig neutrale Verbindungen, solange nicht in einem gewissen Abstand zur Dienongruppe ein neues vinylisches System eingeführt wird, wie bei den schwach anästhesierenden, aus Pfeffer isolierten Isobutyltriensäureamid, die dann außerdem noch etwas bitter schmecken. Rückt die vinylische Gruppe bis auf ein oder zwei Methylenzwischenglieder an das Diensystem heran, wie z.B. bei den Isobutylscharfstoffen der Asteraceen (Tabelle 13, S.80), so verwandelt sich der Bittergeschmack in einen Scharfgeschmack unter Beibehaltung der lokalanästhetischen Wirkung. Die für die Schärfe und Lokalanästhesie gleichermaßen wesentlichen Strukturelemente, nämlich die zur Ausbildung eines verstärkten Dipols befähigte Dienongruppe und das zur Erhöhung der Bindungsfestigkeit an einen hypothetischen Rezeptor notwendige zweite Doppelbindungssystem, haben beide Wirkgruppen des Pfeffers gemeinsam.

Da diese offenbar engen molekular-strukturellen Beziehungen zu derartigen physiologischen Überschneidungen Anlaß geben, ist zu vermuten, daß auch die Wirkmechanismen von Schärfe und Lokalanästhesie verwandt sind, obgleich Unterschiede bezüglich der sensiblen Empfangsorgane festgestellt wurden. Demnach soll der Scharfstoff Piperin spezifisch die Wärmernerven reizen (106, 107). Dagegen kann eine lokalanästhetische Wirkung entweder durch eine Erregung der Kaltrezeptoren, wie beim Menthol (108) und möglicherweise z.T. auch bei den Pfefferlokanästhetika, oder durch eine allgemeine Reizübertragungshemmung in den Nerven zustande kommen (109). Andererseits ist wiederum auffallend, daß eine scharfe und lokalanästhetische "Doppelwirkung" häufig gleichzeitig auftritt, so z.B. bei den Isobutylamidscharfstoffen (Tabelle 13, S.80), beim Eugenol (80), den Monomethylamiden (101), bei Acorus calamus (110) und bei Sedum acre (111).

Möglicherweise sind die Unterschiede beider Wirkungen mehr quantitativer als qualitativer Art, denn auch Piperin nähert sich, zumindest was die Dipolbildung anlangt, noch mehr einem gebräuchlichen Lokalanästhetikum als die eigentlichen Pfefferlokanästhetika.

So hat das offenbar nicht scharfe Pipecain eine, dem Cocain vergleichbare Wirkung (112).



Auf der anderen Seite ist keine lokalanästhesierende Substanz bekannt, deren Amidstickstoff Bestandteil eines cyclischen Amins ist. Daraus ergeben sich zwei Alternativen: entweder ist beim Piperin eine potentielle, lokalanästhesierende Wirkung vollständig vom dominierenden Scharfgeschmack überdeckt oder sie geht nach Einbau des Amidstickstoffs in einen Ring verloren.

2. Pharmakologie und biologische Wirkungen der Pfefferinhaltsstoffe

Zahlreiche volksmedizinische und therapeutische Anwendungen des Pfeffers sind mit Sicherheit auf das ätherische Öl zurückzuführen, so z.B. die Verwendung bei Hautkrankheiten, als Expektorans, Stomachicum und Carminativum.

Die verdauungsfördernde und appetitsanregende Wirkung des Pfeffers könnte zusätzlich durch die im Pfeffer enthaltene Lipase und die langkettigen Isobutyltrienamide bedingt sein. Von ähnlichen Verbindungen ist z.B. eine speichelflußfördernde Wirkung bekannt (113). Diese Vermutungen wurden durch die Untersuchungen Glatzels unterstützt (1), der eine Erhöhung des Speichelflusses und der Amylaseaktivität beim Genuß mit Pfeffer gewürzter Speisen feststellen konnte.

Die durch Piperin ausgelöste Reizung der Wärmernerven führt reflektorisch zu einer Erregung der thermolytischen Zentren (114). Diese wiederum steigert den Wärmefluß und senkt die Körpertemperatur, womit die Verwendung des Pfeffers als Fiebermittel erklärbar wäre.

Die darüber hinaus von Piperin festgestellte, zentralerregende Wirkung auf das Atemzentrum (115), dürfte mit einer Förderung der Durchblutung und Erhöhung des ganzen Stoffwechsels verbunden sein. Hiermit ließe sich die Verwendung des Pfeffers als Stimulans deuten.

Wenn man annimmt, daß die von vielen anderen lokalanästhesierenden Naturstoffen bekannten Nebenwirkungen auch für Pfefferlokanalästhetika zutreffen, hätte man auch eine sinnvolle Erklärung für die Anwendung als Stimulans (verf. Kawa-Pyrone), Aphrodisiakum (verf. Yohimbin) und als Antineuralgikum (s.Tab.11/12, S.74/75). Auch taenizide (5) und insektizide (116) Wirkung kann mit den lokalanästhesierenden Pfeffersubstanzen in Zusammenhang gebracht werden.

Interessant ist, daß Verbindungen mit einem Methylendioxyphenylring (117-119), gleich dem Piperin (117), Piperettin (120) und Sesamin (121) synergistisch die Wirkung von Insektiziden steigern. Da die Pfefferlokalanästhetika das gleiche Strukturelement enthalten, ist mit einer moleküleigenen synergistischen und somit gesteigerten insektiziden Wirkung zu rechnen.

Hieraus ergibt sich, daß viele, bislang abwegig erscheinende Anwendungsarten des Pfeffers, möglicherweise doch eine kausale Ursache haben.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Aus dem durch Dichlormethanextraktion von Piper nigrum gewonnenen Pfefferöl konnten in einem komplizierten säulenchromatographischen Trennverfahren außer den bereits bekannten Scharfstoffen - Piperin, Piperanin, Piperylin, Piperettin - eine weitere scharfschmeckende Substanz sowie drei stark und vier schwach anästhesierende und drei neutrale Säureamide neben einigen Lipiden isoliert werden.
2. Die Substanzen wurden durch UV-, IR-, NMR- und Massenspektroskopie identifiziert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Die scharf schmeckende Verbindung konnte als ein cis-trans-Isomeren- und Dimerengemisch des Piperins (Dipiperin) identifiziert werden.

Die drei stark anästhesierenden Substanzen wurden als N-Isobutyl-9 (bzw. 11 und 13)-Methylendioxyphenyl-nona (bzw. undeca und trideca)-2,4,8 (bzw. 10 und 12)-trienamide aufgeklärt. Massenspektroskopisch konnten noch zwei weitere höhere Homologe nachgewiesen werden. Wegen der, im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal entdeckten, anästhesierenden Wirkung der Substanzen, wurden sie als Pfefferlokanästhetika bzw. Piperaesthin A, B, C, (D, E) bezeichnet. Bei den schwach anästhesierenden Stoffen handelte es sich um die langkettigen N-Isobutyl-eicosa (bzw. octadeca, heneicosa und nonadeca)-trans-2-trans-4-cis-9 (bzw. 10, 12 oder 14), trienamide.

Die neutralen Säureamide wurden als N-Isobutyl-eicosa (bzw. octadeca und hexadeca)-trans-2-trans-4-dienamide identifiziert. Bei den Lipiden handelte es sich um β - und δ -Sitosterin sowie um ein Kohlenwasserstoffgemisch mit einfach ungesättigten Alkanen.

3. Für Piper nigrum - Extrakte wurde eine DC-Methode entwickelt, die den Nachweis nahezu aller bekannten und neu isolierten säureamidartigen Verbindungen gestattet und damit eine einfache Identitäts-, Reinheits- und auch Qualitätsprüfung des Pfeffers

ermöglicht. Durch DC ist auch eine einfache und schnelle Unterscheidung von *Piper nigrum* und *album* möglich.

4. Zur Scharfwertbestimmung wurde ein GC-Verfahren ausgearbeitet, das auf der quantitativen Bestimmung des mengenmäßig und im Schärfegrad dominierenden trans-trans-Piperins basiert.
5. Sensorische Analysen und theoretische Überlegungen über mögliche Strukturwirkbeziehungen zwischen Pfefferlokanästhetika und Pfefferscharfstoffen führten zu dem Ergebnis, daß Schärfe und Lokalanästhesie möglicherweise mehr durch quantitative als qualitative Unterschiede in der Wirkweise bedingt sein könnten.
6. Es wurde versucht, die bekannten pharmakologischen Wirkungen des Pfeffers den isolierten Verbindungen zuzuordnen.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Herkunft der Droge

Der Pfeffer wurde von der Fa. Loibl/München aus Chargen der Jahre 1972 - 1975 bezogen.

2. Allgemeine Arbeitsmethoden

2.1. Herstellung des Pfefferextrakts

Der zu Pulver gemahlene Pfeffer wurde chargenweise à 250 g mit Dichlormethan ein bis zwei Tage lang erschöpfend am Soxhlet extrahiert. Das Extraktionsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer weitgehend abgezogen. Als Rückstand wurde das Pfefferöl in 10 %iger Ausbeute erhalten. Es diente zu Voruntersuchungen und zur Isolierung der einzelnen Substanzen.

2.2. Dünnschichtchromatographisches Screening Verfahren

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfolien der Fa. Merck, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 cm.

Die Folien wurden vor Gebrauch mit der Schere halbiert.

Fließmittel: Benzol + Diisopropyläther + Dioxan/62,5 + 21,5 + 16.

Es war keine Kammersättigung nötig. Das Laufmittel konnte aber mehrmals benutzt werden.

Laufstrecke: ca. 9 cm

Laufzeit: 30 - 35 Min.

Detektion: UV₂₅₄ und UV₃₆₆, sowie konz. Schwefelsäure.

Die Substanzlösungen wurden mit einem an der Spitze ausgezogenen Schmelzpunktsröhrchen, ca. 1 cm vom unteren Plattenrand entfernt, punktförmig aufgetragen. Auf einer Folienhälfte konnten zwischen 50 - 60 Testtropfen gleichzeitig chromatographiert werden.

Die Platten wurden bis zum oberen Plattenrand, d.h. ca. 9 cm hoch, entwickelt. Nach oberflächlichem Abdunsten des Fließmit-

tels wurden die aufgetrennten Substanzen unter dem kurz- und langwelliger UV-Licht auf den Platten lokalisiert. Anschließend wurden die Platten mit konz. Schwefelsäure besprüht, und zwar noch bevor das Laufmittel gänzlich verdunstet war, zumal die Färbungen dann kontrastreicher zutage traten.

2.3. Präparative Dickschichtchromatographie für die orientierende Geschmacksprüfung

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten der Fa. Merck
20 x 40 cm, Schichtdicke 2 mm.

Fließmittel: Benzol + Diisopropyläther + Dioxan/62,5 + 21,5 + 16

Laufstrecke: ca. 18 cm

Laufzeit: 7 - 8 Stunden

Detektion: UV₂₅₄

Von den in Chloroform gelösten Substanzen wurden 1,5-2 cm vom unteren Plattenrand entfernt, mit dem Autoliner, einem elektrischen Auftragegerät, strichförmig insgesamt etwa 0,5-1,0 g aufgetragen. Die Platten wurden im oben angegebenen Fließmittel ohne vorherige Kammersättigung entwickelt. Nach kurzem Abdunsten des Lösungsmittels wurden die, im kurzwelligen UV-Licht absorbierenden und sich gegen den fluoreszierenden Plattengrund abhebenden Zonen, mit einem Bleistift markiert, ausgeschabt, in eine kleine Säule gefüllt und mit Methanol extrahiert. Das Methanol wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethanol gelöst und zum Auskristallisieren aufgestellt. Ein Teil der Lösung wurde für die Geschmacksprüfung verwendet.

2.4. Säulenchromatographische Isolierung

2.4.1. Herstellung und Vorbereitung der Säulen

Für die Säulenchromatographie wurden zwei verschiedene Adsorbentien verwendet:

1. Aluminiumoxid für die Säulenchromatographie nach Brockmann, Aktivitätsstufe II-III, der Fa. Merck.
2. Kieselgel für die Säulenchromatographie mit 40 % rel. Feuchte, 70-230 mesh.

Da die am Ende der Säule austretenden Pfefferfraktionen oftmals sehr viskos waren und dazu neigten, den Säulenausfluß zu verstopfen und die Hähne zu verkleben, so daß die Tropfgeschwindigkeit nicht mehr geregelt werden konnte, wurden die Hähne durch Teflonschläuche von 1,5 - 2 mm i. Ø mit Schlauchklemmen ersetzt. Über den Säulenausgang wurde etwas Watte gestopft und der konische Teil der Säule mit gereinigtem Seesand aufgefüllt. In die Säulen wurde bis zur halben Höhe Elutionsmittel geschüttet und das Adsorbens portionsweise entweder eingestreut (Aluminiumoxid) oder als gießfähiger Suspensionsbrei eingeschlämmt (Kieselgel). Eine gleichmäßige Füllung wurde durch wiederholtes Klopfen an die Säule erreicht. Während des Füllvorgangs durfte auf keinen Fall mit einem Glasstab gerührt werden. Sämtliche Säulen wurden gekühlt.

Vor dem Aufbringen des zu trennenden Substanzgemisches ließ man die Säulen noch einen Tag stehen, damit sich die Säulenfüllung weiter komprimieren und eine gleichmäßige Temperatur über den ganzen Säulenquerschnitt einstellen konnte.

Die Oberfläche des Adsorbens wurde durch drei Filterpapiere, die man vorsichtig durch überstehendes Elutionsmittel hinabgleiten ließ, abgedeckt.

Die zu trennenden Substanzgemische wurden entweder als Lösung im Eluans oder als Verreibung mit Adsorbens auf die Säule aufgebracht.

2.4.2. Isolierung der Substanzen

(s. Abb. 2 und 3, S.11 u.13)

Der einleitende Schritt der Isolierung war die Grobtrennung. Hierzu wurden 100 g Pfefferöl in wenig Dichlormethan gelöst und über eine Aluminiumsäule gegeben. Die Säule hatte einen Innendurchmesser von 6,5 cm und war mit 1 kg Al_2O_3 gefüllt, welches etwa einer Füllhöhe von 28 cm entsprach. Als Eluans diente Dichlormethan. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 35 - 40 ml/h. Da-

mit das notwendige Ausgangsmaterial vorhanden war, um alle Substanzen in genügend großer Ausbeute isolieren zu können, wurde dieser Schritt zweimal durchgeführt:

1. und 2. Säule: 6,5 cm i Ø, 1 kg Al_2O_3 (28 cm hoch), Dichlormethan, 35 - 40 ml/h, Probemenge je 100 g Pfefferöl.

Bei dieser Trennung wurden vier Hauptfraktionen A, B, C und D erhalten. Aus Fraktion C konnte nacheinander etwas Substanz 5, 11 und 15 isoliert werden. Die Mutterlauge von Fraktion C sowie der Fraktionen B und D wurden vereinigt und nochmals über eine Al_2O_3 -Säule getrennt.

3. Säule: 2,3 cm i Ø, 103 g Al_2O_3 , Dichlormethan, 20 ml/h.

Aus den hier anfallenden Fraktionen wurde die Hauptmenge von Substanz 11 und 15 gewonnen.

Fraktion A = 144 g Öl wurde an 125 g Kieselgel adsorbiert, die Menge geteilt und auf zwei parallel laufenden Kieselgelsäulen getrennt.

4. und 5. Säule: 10 cm iØ, 2 - 2,1 kg Kieselgel (50 cm hoch)
Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 65 + 30 + 5
2 Tage 40 ml/h, dann 60 ml/h, Probemenge je 72 g.

Es wurden acht neue Fraktionen a, b, c, d, e, f, g und h erhalten. Fraktion a bildete den Vorlauf, Fraktion b enthielt Substanz aus den DC-Zonen XII und I, Fraktion c aus I, Fraktion d aus I und II, Fraktion e aus I - V, Fraktion f aus II - V, Fraktion g aus III - VIII und Fraktion h aus V - X.

Fraktion e und f (zusammen ca. 50 g) wurden erneut an zwei gleichen Kieselgelsäulen aufgetrennt:

6. und 7. Säule: 5,5 cm iØ, 1,1 kg Kieselgel (85 cm hoch),
Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 70 + 20 + 10
105 ml/h, Probemenge je 25 g.

Die übrigen Fraktionen a - d, g und h wurden entweder direkt, oder gemäß ihrer DC-Zusammensetzung mit den entsprechenden Fraktionen der 6. und 7. Säule vereinigt und an Aluminiumoxidsäulen weiter aufgetrennt. Die nun erhaltenen Fraktionen wurden wieder ihrer stofflichen Zusammensetzung gemäß vereinigt und erneut an weiteren Aluminiumoxidsäulen getrennt. Insgesamt wurden 20 Al_2O_3 -Säulen für diesen Isolierungsabschnitt benötigt.

8. - 27. Säule:

- 3 Säulen mit 3 cm iØ, 280 g Al_2O_3 (40 cm hoch),
Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 70 + 20 + 5,
20 - 25 ml/h, Probemenge 3 - 4 g
- 10 Säulen mit 3,5 cm iØ, 400 - 700 g Al_2O_3 (40 - 50 cm hoch),
Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 65 + 30 + 5,
20 - 50 ml/h, Probemenge 2 - 5 g
- 5 Säulen mit 5 cm iØ, 700 - 950 g Al_2O_3 (35 - 50 cm hoch),
Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 65 + 30 + 5,
30 - 50 ml/h, Probemenge 3 - 6 g
- 1 Säule mit 5,5 cm iØ, Al_2O_3 (50 cm hoch),
Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 65 + 30 + 5,
30 ml/h, Probemenge 8 g
- 1 Säule mit 6,5 cm iØ, Al_2O_3 (40 cm hoch),
Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 65 + 30 + 5
40 ml/h, Probemenge 40 g.

Bis hier konnten bereits eine Reihe von Substanzen isoliert werden. Aus den vorderen Fraktionen waren es die Substanzen 1 - 4, 5, 13, 17, aus den mittleren Fraktionen 7, 15, 6, 12 und aus den letzteren Fraktionen Piperanin, 12 und Piperin.

Die Substanzen wurden durch mehrmaliges Um- und Auskristallisieren aus Aceton und Äthanol bei + 4° oder - 10° C gereinigt.

Für den folgenden, zweiten Teil der Isolierung wurden sämtliche Mutterlaugen des vorangegangenen ersten Isolierungsteils vereinigt und erneut an einer Kieselgelsäule aufgetrennt:

28. Säule: 5,5 cm iØ, 1,1 kg Kieselgel (85 cm hoch),
Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 70 + 20 + 10
ca. 120 ml/h, Probemenge 20 g

Vier Fraktionen wurden aufgefangen und gleich darauf nochmals über vier Aluminiumoxidsäulen getrennt:

29. - 32. Säule:

2 Säulen mit 3 cm iØ, 310 - 380 g Al_2O_3 (45 - 55 cm hoch),
2 Säulen mit 3,5 cm iØ, 480 - 500 g Al_2O_3 (45 - 50 cm hoch),
alle Säulen: Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 65 + 30 + 5,
25 ml/h, Probemenge 2,1 - 3,3 g

Aus einigen hierbei erhaltenen Fraktionen konnte noch etwas Substanz 1 - 4, 15 und 7 isoliert werden.

Alle Fraktionen und Mutterlaugen wurden darauf wieder dc überprüft und entsprechend vereinigt. Die Sammelfraktion der letzteren Fraktionen (DC-Zonen II - V) wurden nochmals an einer Aluminiumoxidsäule getrennt:

33. Säule: 3,5 cm iØ, 700 g Al_2O_3 (57 cm hoch),
Benzol/Diisopropyläther/Dioxan = 65 + 30 + 5 + 1% H_2O
25 ml/h.

Die Fraktionen dieser Säule und die übrigen Fraktionen der 29.-32. Säule wurden dann solange an zahlreichen Kieselgelsäulen weiter getrennt und dabei die jeweils aufgefangenen Fraktionen ihrer stofflichen Zusammensetzung entsprechend wieder vereinigt und nochmals chromatographiert, bis die Substanzen schließlich in genügend großer Reinheit und Ausbeute anfielen.

Insgesamt wurden für diesen Isolierungsteil 33 Säulen verwendet, von denen 19 (34. - 52. Säule) zur weiteren Anreicherung und die übrigen 14 (53. - 66. Säule) insbesondere zur Reinigung dienten. Für die

34. - 52. Säule wurden vier Säulen (a), (b), (c) und (d) mit unterschiedlichem Innendurchmesser gewählt und die Adsorbensmenge der Probemenge entsprechend verändert.

3 Säulen (a): 1,5 cm iØ, 10 - 20 g Kieselgel,
Probemenge 0,05 - 0,2 g

8 Säulen (b): 2,0 cm iØ, 40 - 60 g Kieselgel,
Probemenge 0,25 - 0,5 g

6 Säulen (c): 2,5 cm iØ, 55 - 85 g Kieselgel,
Probemenge 0,6 - 1,0 g

2 Säulen (d): 3,5 cm iØ, 100 - 250 g Kieselgel,
Probemenge 1,35 - 1,8 g

Das für alle Säulen verwendete Eluans Benzol/Diisopropyläther/
Dioxan wurde wie folgt variiert:

65 + 20 + 15

70 + 20 + 10

80 + 10 + 10

85 + 10 + 5

Die Tropfgeschwindigkeit betrug 5 - 7 ml/h bei Säule (a), (b)
und (c), 10 - 15 ml/h bei Säule (d).

Für die

53. - 66. Säule wurden wiederum die Säulen (a) - (d) verwendet:

3 Säulen (a): Probemenge 0,1 - 0,15 g

4 Säulen (b): Probemenge 0,3 - 0,35 g

4 Säulen (c): Probemenge 0,5 - 0,8 g

3 Säulen (d): Probemenge 0,9 - 1,4 g

Das Eluans war entweder reines Cyclohexan oder Cyclohexan/
Äthanol = 90 + 10 oder 95 + 5, letzteres zumeist mit 0,1 % H₂O.

Am Ende dieses Isolierungsteils fielen die Substanzen 6, 7 und
8 bereits in den Fraktionsgläsern kristallin aus. Substanz 8
und die ölige Substanz 20 (cis-trans-Isomere des Piperins + Di-
piperin) konnten an dieser Stelle erstmal isoliert werden.
Ferner wurden im Verlauf dieses Isolierungsabschnitts einige
Fraktionen mit weiteren Homologen der Substanz 17 und höheren
der Substanz 7 erhalten.

3. Physikalisch-chemische Untersuchungen^{*}

3.1. Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Koflerschen Heiztisch bestimmt. (Die Werte sind unkorrigiert angegeben).

3.2. UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Beckman DK-2A Spektrophotometer aufgenommen.

3.3. IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit einem Beckman-Infrarotspektrometer gefahren. Substanz 20 wurde unverdünnt in dünner Schicht zwischen zwei Natriumchloridplatten, alle übrigen Substanzen in Kaliumbromid gemessen.

3.4. H-NMR-Spektren

Die Aufnahme der Kernresonanzspektren erfolgte mit einem Kernresonanzspektrometer vom Typ Varian A-60 am Institut für Arzneimittellehre der Universität München und mit einem HA-100 Gerät am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. Die Substanzen wurden in Deuterochloroform (CDCl_3) gelöst.

3.5. Massenspektren

Die Massenspektren wurden an unserem Institut mit einem Massenspektrographen MS 30 und am Institut für organische Chemie der Universität München mit einem hochauflösenden Gerät MS 902, beide von der Fa. AEI, Manchester, aufgenommen.

3.6. Optische Drehung

Die optische Drehung wurde mit einem lichtelektrischen Polarisimeter LEP A2 der Fa. Zeiss gemessen.

^{*}Für die Aufnahme der Spektren danke ich insbesondere Herrn Dr.O. Seligmann, (Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre, München), Frau Schild (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) und Herrn Dr. U.Seidel (Institut für organische Chemie, Universität München).

4. Strukturaufklärungen

4.1. Substanzen 1 - 4

Schmelzpunkte:

Subst. 1	87-88°	(Aceton)
Subst. 2	89	(Aceton)
Subst. 3	91-92°	(Aceton)
Subst. 4	90-91°	(Aceton)

DC: Kieselgel GF₂₅₄

Laufmittel und Detektion S. 88 und 56 ff

Zone I, entspricht etwa Rf 0.85 - 0.9

Substanz 1 - 4 sind Gemische von je drei Substanzen mit den Molekulargewichten und Summenformeln:

M ⁺ 363	C ₂₄ H ₄₇ NO
M ⁺ 335	C ₂₂ H ₄₃ NO
M ⁺ 307	C ₂₀ H ₃₉ NO

UV (MeOH) Gemisch Subst. 1-4: $\lambda_{\max}$ 258 nm

IR (in KBr): Abb.4, S. 17, Tabelle 15 a/b S.107 und 108

MS: m/e (% Rel.Int.) (Die Daten sind, stellvertretend für alle anderen dem Spektren der Substanz 4 entnommen).

M⁺ 363(3), 348(1), M⁺ 335(26), 334(4), 320(11), M⁺ 307(3), 293(3), 292(8), 291(9), 282(3), 280(8), 279(9), 265(9), 264(24), 263(100), 250(3), 236(5), 235(10), 222(4), 208(4), 194(4), 180(13), 167(8), 166(17), 152(63), 138(7), 126(12), 113(38), 96(63), 81(86), 67(40), 57(61), 55(42), 43(53), 41(54).

H-NMR(in CDCl₃, 60MHz, TMS, int.)

Tabelle 16, S.109.

4.2. Substanzen 13 und 17

Schmelzpunkte:

Subst. 13	73-82°	(Aether)
Subst. 17	43-59°	(Aceton)

DC: Kieselgel GF₂₅₄

Laufmittel und Detektions s. S. 88 und 56 ff
Zone I, entspricht etwa Rf 0.85-0.9

Substanz 13 sowie 17 sind Gemische homologer Substanzen:

Subst. 13:

M⁺ 363 C₂₄H₄₇NO
M⁺ 361 C₂₄H₄₅NO
M⁺ 335 C₂₂H₄₃NO
M⁺ 333 C₂₂H₄₁NO

Subst. 17:

M⁺ 361
M⁺ 333

UV: +

IR: Mit den IR-Spektren der Subst. 1-4 vergleichbar, Abb. 4, S.17,
Tabelle 15 a/b, S. 107/108

MS: m/e (% Rel.Int.)

Subst. 13:

M⁺363(16), M⁺361(63), 248(4), 246(3), M⁺335(56), M⁺333(44),
332(7), 320(15), 318(9), 304(13), 292(9), 291(14), 290(9), 289(15),
280(7), 279(9), 278(4), 276(3), 264(19), 263(75), 262(4), 261(57),
250(54), 248(2), 236(8), 222(5), 220(3), 208(7), 194(7), 181(5),
180(28), 166(24), 152(100), 115(32), 113(42), 96(35), 95(26), 81(54),
69(24), 67(37), 57(49), 55(50), 43(33), 41(40).

Subst. 17:

M⁺361(27), 346(2), M⁺333(100), 332(8), 318(12), 304(5), 291(7),
290(15), 289(13), 276(6), 264(9), 263(15), 262(11), 261(50), 250(9),
248(6), 236(10), 234(6), 233(3), 222(7), 220(4), 208(6), 194(6), 192(5),
181(6), 180(29), 166(17), 152(50), 115(36), 96(24), 95(28), 81(70),
67(43), 57(36), 55(64), 43(27), 41(64).

H-NMR (in CDCl₃, 60 MHz, TMS, int.)

Spektrale Daten von Subst. 17 Tabelle 16, S. 109

4.3. Substanz 5

Schmelzpunkt:

82-84° (Aceton)

DC: Kieselgel, Bedingungen S.88 und 56 ff.

Nach Besprühen mit konz. Schwefelsäure und Verkohlen durch Erhitzen auf $135-150^{\circ}$ im Trockenschrank ist in Zone XII, oberhalb Zone I, bei Rf 0.95 ein grauer Fleck sichtbar.

Gemisch von mindestens 4 Homologen:

M^{+} 476	$C_{34}H_{68}$
M^{+} 448	$C_{32}H_{64}$
M^{+} 420	$C_{30}H_{60}$
M^{+} 392	$C_{28}H_{56}$

UV: leer

IR (KBr): $2965-2850\text{ cm}^{-1}$ (CH_2 und CH_3 -Val.)
 $1460-1450\text{ cm}^{-1}$ (CH_2 und CH_3 -Deform.)
 $1250, 725$ und 717 cm^{-1} (CH_2)₄-rocking

MS: m/e (% Rel.Int.)

M^{+} 476(1), M^{+} 448(7), M^{+} 420(7), M^{+} 392(5), 364(2),
195(4), 181(6), 167(7), 153(11), 139(15), 125(25), 111(44), 97(83),
83(83), 71(56), 69(69), 57(100), 55(77), 43(81), 41(46).

4.4. Substanz 15

Schmelzpunkt $135-136$, gelegentlich $146-148^{\circ}$

DC: Kieselgel GF₂₅₄

Laufmittel und Detektion S.88 und 56 ff

Zone XI, entspricht etwa Rf 0.8

Identifizierung erfolgte mit Vergleichssubstanz.

Gefunden: C 83.23 %, H 10.17 %, M^{+} 414,

berechnet: $C_{29}H_{50}O$: C 84 %, H 12 %, O 3,9 %

Optische Drehung: gefunden: $[\alpha]_D^{25} = -25.8^{\circ}$ ($c = 0.490$ in Chlf.).

UV: leer

IR (KBr): 3400 s (OH), 2940s (CH₂-Val.), 2860s (CH₃-Val.),
1625w (isoliertes C=C), 1450s (assym.CH₃),
1375s und 1360s (CH(CH₃)₂),
1180w(CH(CH₃)₂), 1125w, 1055s und 1045s (C-O), 1015w(C-O),
1000w, 965w(CH≡CH), 952m, 920w, 850w, 795w (CH(CH₃)₂), 772w.

MS: m/e (% Rel.Int.)

M⁺ 414(52), 396(34), 381(31), 329(34), 303(42), 255(45), 231(31),
213(47), 159(50), 145(52), 107(56), 95(69), 81(64), 69(56), 55(100),
41(42), 43(50).

Identifizierung

4.5. Scharfstoffe (außer Substanz 20):

Schmelzpunkte: s. S. 29

DC: s.S. 30, 56 ff und 88

Piperin	M ⁺ 285	C ₁₇ H ₁₉ N ₃	} Identifizierung mit authentischen Vergleichssubstanzen.
Piperanine	M ⁺ 287	C ₁₇ H ₂₁ O ₃ N	
Piperylin	M ⁺ 271	C ₁₆ H ₁₇ O ₃ N	
Piperettin	M ⁺ 311	C ₁₉ H ₂₁ O ₃ N	

UV (MeOH): Tabelle 14, S. 106

IR (in KBr): Piperin, Piperylin, Piperettin } Tabelle 15
(in Nujol): Piperanin } a/b, S.107/108

H-NMR (in CDCl₃, 60 MHz, TMS, int.): Tabelle 17, S. 110

MS: m/e (% Rel.Int.)

Piperin: M⁺285(97), 202(33), 201(100), 200(19), 174(27), 173(34),
172(20), 171(19), 159(5), 144(11), 143(23), 137(11), 135(4), 116(16),
115(69), 114(8), 113(4), 112(6), 89(10), 84(19), 69(4), 65(5), 63(8),
55(6), 51(4), 42(8), 41(10), 39(7).

Piperylin: M⁺271(42), 202(19), 201(100), 200(13), 174(8), 173(23),
172(13), 171(12), 159(4), 144(4), 143(14), 135(2), 116(8), 115(40),
114(5), 98(7), 89(6), 70(6), 65(4), 63(6), 55(5), 41(4), 39(4).

Piperettin: M^+ 311(64), 227(36), 226(48), 200(21), 199(47), 198(26),
197(18), 170(15), 169(76), 141(100), 139(19), 135(39), 115(41),
113(12), 112(56), 84(27), 77(11), 69(34), 41(21), 39(9).

^{13}C -NMR von Piperin: Tabelle 19, S.112.

Strukturaufklärung

4.6. Substanz 20

Öl

DC: Kieselgel

Bedingungen s.S.88 und 56 ff

M^+ 570 $C_{34}H_{38}O_6N_2$

M^+ 572 $C_{34}H_{40}O_6N_2$

M^+ 596 $C_{36}H_{40}O_6N_2$

UV (MeOH): 240 nm E_{mol} 5672

298 nm -

335 nm E_{mol} 29871

IR (als Öl zwischen NaCl-Platten)

Dem Piperin-Spektrum (Tabelle 15 a/b) weitgehend vergleichbar. Gegenüber dem Piperinspektrum fehlen lediglich die beiden starken Banden im Bereich

1575-1580 cm^{-1} (doppelte Konjugation zum Arylkern) und
990-1010 cm^{-1} (trans-trans-Doppelbindung)

H-NMR (in $CDCl_3$, 60 MHz, TMS, int.)

ist auch dem Piperin-Spektrum (Tabelle 17, S.110) vergleichbar:

δ = 1.64(s) und δ = 3.60 ppm(s) (Methylengruppen des Piperidinrings), δ = 5.99 ppm(s) (Methylendioxygruppe), δ = 6.87 ppm(s) (arom.Protonen), δ = 5.92 - 7.86 ppm(m) (vinylische Protonen),

δ = 2.00 - 2.40 ppm(m) (Cyclobutan-, Methin- oder Allylprotonen)

MS: m/e (% Rel.Int.), Abb.8, S. 31.

M⁺596(<1), M⁺572(5), M⁺570(3), 512(1), 511(4), 487(4), 486(11),
485(37), 484(2), 467(2), 460(5), 459(4), 458(7), 457(4), 437(2), 424(1),
401(1), 400(4), 399(2), 398(2), 375(3), 374(7), 373(22), 372(28), 371(2),
352(3), 350(5), 346(4), 345(6), 344(4), 337(2), 336(5), 328(0,5),
324(3), 322(3), 320(1), 312(6), 311(11), 310(26), 309(2), 302(0,5),
299(3), 298(2), 297(1), 294(1), 287(2), 286(10), 285(40), 284(8),
277(1), 276(0,6), 268(2), 267(2), 260(2), 259(1), 251(8), 250(2), 247(3),
246(0,7), 227(6), 226(10), 225(8), 224(3), 223(7), 211(3), 209(5),
203(4), 202(20), 201(41), 200(16), 199(8), 198(6), 197(3), 175(8),
174(21), 173(31), 172(16), 171(10), 149(14), 148(7), 144(7), 143(12),
141(8), 137(11), 135(100), 115(27), 112(95), 86(23), 85(14), 84(71),
69(96), 41(75).

¹³C-NMR: Tabelle 20, S.113.

Strukturaufklärungen:

4.7. Substanz 6

Schmelzpunkt: 134-136°

DC: Kieselgel GF₂₅₄

Laufmittel und Detektion s. S.56 ff und 88

Zone III, entspricht etwa R_f 0.75 - 0.8

Hochauflösendes MS: Auflösung 140 ppm, 40 eV

M⁺ 327.177 C₂₀H₂₅O₃N

UV (MeOH): 210 nm

264 nm Hauptbande

310 nm

IR (KBr): Tabelle 15 a/b, S. 107/108

H-NMR (CDCl₃), 100 MHz, TMS, D₂O-Austausch), Tabelle 18, S.111

MS: Auflösung wie oben, Abb. 12 und 13. S.49

M^+ 327(39), 312(1), 255(s.127.5), 201(1), 165(2), 163(2), 162(14),
161(100), 149(5), 135(4), 132(7), 131(60), 127,5(6), 123(2), 119(2),
109(1), 103(15), 95(3), 77(5), 69(4), 60(7), 57(4), 55(10), 44(42),
43(46).

4.8. Substanz 8

Schmelzpunkt: 124 - 125°

DC: Kieselgel GF₂₅₄

Laufmittel und Detektion s.S.56 ff und 88

Zone XI, entspricht etwa Rf 0.8

Hoehauflösendes MS: Auflösung 150 ppm, 70 eV

M^+ 355.214 $C_{22}H_{29}O_3N$

UV (MeOH): 210 nm (Schulter)

260 nm (Hauptbande) E_{mol} 45665

310 nm (Schulter)

IR (KBr): = Subst. 7, Tabelle 15 a/b, S.107/108

H-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, TMS, D_2O -Austausch) Tabelle 18, S.111

MS: Auflösung wie oben, Abb. 14 und 15, S.51

M^+ 355(100), 340(3), 329(6), 311(6), 283(s.141.5), 255(12), 240(13),
228(9), 223(21), 220(41), 215(9), 194(5), 188(5), 187(11), 180(12),
174(8), 173(7), 167(7), 166(9), 162(9), 161(24), 159(6), 154(15),
152(46), 151(33), 150(8), 149(16), 148(19), 141.5(33), 135(80),
131(36), 128(13), 121(29), 115(15), 109(14), 96(20), 95(24), 81(27),
57(39), 44(46), 43(53).

4.9. Substanz 7

Schmelzpunkt: 114 - 116°

DC: Kieselgel GF₂₅₄

Laufmittel und Detektion s.S.56 ff und 88

Zone II, entspricht etwa Rf 0.8 - 0.85

Hoehauflösendes MS: Auflösung 140 ppm, 17 eV

M^+ 383.247 $C_{24}H_{33}O_3N$ M^+ 411 $C_{26}H_{37}O_3N$

M^+ 397 $C_{25}H_{35}O_3N$

UV (MeOH): 210 nm (Schulter)
260 nm (Hauptbande)
310 nm (Schulter)

IR (KBr): Tabelle 15 a/b, S.107/108

H-NMR (CDCl_3), (100 MHz, TMS, D_2O -Austausch): Tabelle 18, S.111

MS: Auflösung wie oben, Abb. 16 und 17, S.53

$\text{M}^+_{411}(22)$, $\text{M}^+_{397}(8)$, $\text{M}^+_{383}(91)$, 257(22), 248(61), 223(52),
208(28), 194(20), 191(30), 189(16), 180(5), 179(27), 178(21),
177(25), 166(23), 165(34), 164(23), 161(30), 154(34), 153(30),
152(90), 151(74), 150(23), 149(39), 148(19), 141(28), 139(39),
138(28), 137(40), 136(26), 135(55), 131(21), 126(38), 125(57),
124(44), 123(44), 113(18), 112(34), 111(91), 110(50), 109(50),
105(11), 99(8), 98(43), 97(100), 96(94), 95(75), 85(66), 84(44),
83(66), 82(66), 81(38), 71(69), 70(50), 57(84), 44(15), 43(22),
42(25), 41(25), 40(22).

5. Analytische Verfahren zur Identifizierung und Wertbestimmung von Piper nigrum

5.1. Qualitative Dünnschichtchromatographie von Piper nigrum und Piper album

Untersuchungsmethode

Die Untersuchungsbedingungen waren mit denen des Screening-Verfahrens identisch.

Untersuchungslösung

Je 1 g der gepulverten Früchte von Piper nigrum und Piper album wurden mit 10 ml Dichlormethan 1 Std. unter Rückfluß erhitzt. Der Extrakt wurde mit leichtem Unterdruck durch eine D 1 - Fritte abgesaugt und der Rückstand solange mit Dichlormethan (ca. 30-40 ml) nachgespült, bis die abfließende Lösung nicht mehr gefärbt war. Denselben Effekt erzielte man auch, wenn man mehrere Stunden am Soxhlet extrahierte.

Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und in 20 ml Chloroform wieder aufgenommen.

Vergleichslösungen

Für die Vergleichslösungen wurden die isolierten Substanzen in Chloroform gelöst. Es wurden folgende Lösungskonzentrationen gewählt:

Piperin	1,0 mg/ml	}	= 10 µg/µl
Substanz 1 - 4	0,1 mg/ml		
Substanz 13	"		
Substanz 7 + 8	0,2 mg/ml		
Substanz 6	0,1 mg/ml	}	= 1 µg/µl
Piperanin	"		
Piperettin	"		
Piperylin	"		
Substanz 20	"		

Auftragsmenge

Von der Piperettin- und Substanz-20-Lösung wurden je 20 µl, von allen übrigen - Untersuchungs- und Testlösungen - je 10 µl punktförmig mit der Blutzuckerpipette aufgetragen.

5.2. Gaschromatographische Gehaltsbestimmung des Piperins in Piper nigrum und Piper album

1 - 2 g (genau gewogen) frisch gemahlene, mittelfeine Droge bzw. die Pulverdroge des Handels wurden mit 10,00 ml Standardlösung (50 mg Arachinsäuremethylester in 10,00 ml Dichlormethan) versetzt und im Omnimixer (Sorvall^R) zwei Minuten bei etwa 10 000 U/Min. extrahiert. Für diese kurze Zeit war keine Kühlung notwendig. Die Lösung wurde filtriert und für die Bestimmung verwendet.

Zuvor wurde der Korrekturfaktor bestimmt. Dazu wurden 100 mg Piperin und 100 mg Arachinsäuremethylester genau gewogen und

in 10 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde vor Lichteinfluß durch Umwickeln des Fläschchens mit Alufolie geschützt, um weitere Isomerisierung und Dimerisierung des Piperins zu vermeiden. Bei mehreren Untersuchungen dieser Lösung ergab sich bei der Berechnung als Mittelwert für Piperin ein Korrekturfaktor von $f = 0.73$ bezogen auf Arachinsäuremethylester als innerer Standard bei Verwendung eines Flammenionisationsdetektors. Die Gaschromatographie wurde wie folgt durchgeführt:

Apparat: Perkin Elmer 900;
 Säule: Glas, 1,8 x 2 mm i.D.; Säulenfüllung: 10 % UCCW 982 auf Chromosorb W AW DMCS 80 - 100 mesh;
 Temperaturen:
 Säulenofen: 200-260° C, linear programmiert mit 3°/Minute;
 Injektor und Detektor: je 300°C;
 Gasdurchfluß: ca. 30 ml Argon/Minute;
 Detektor: FID ($H_2 : O_2 = 35 : 350$ ml/Min.);
 Empfindlichkeit: Range 10, Attenuation 512;
 Einspritzmenge: ca. 3-6 µl der Analysenlösung;
 Schreiber: Perkin-Elmer S 56, 2,5 mV,
 Papiervorschub: 5 mm/Minute;
 Integrator: Perkin-Elmer D 26 mit Kienzle Drucker D 21;
 Empfindlichkeit: 0,5 µV/Sekunde.

Berechnung:

$$\% \text{ Piperin} = \frac{\text{Flächeneinheiten}_{\text{Piperin}} \times \text{mg}_{\text{Standard}}}{\text{Flächeneinheiten}_{\text{Standard}} \times \text{mg}_{\text{Droge}} \times f} \times 100$$

Tabelle 14:

UV-Absorptionen der Scharfstoffe (122)

Piperin	Piperanin	Piperettin	Piperylin	Bandentyp	Zuordnung		
					Benzol- banden $\pi \rightarrow \pi^*$	ET $\pi \rightarrow \pi^*$	LE $n \rightarrow \pi^*$
	210			Schulter	λ_2		
244 254		234 254	244 254	} kleine Dop- pelbande	λ_2		
	260			Hauptbande	λ_3	CO + 1 konj. =	
	268			Schulter			
298 310		310 322	300 310	} Schultern	λ_3		x
	310-320			Schulter			x
	340			Schulter			
340			343	Hauptbande		CO + 2 konj. =	
		358		Hauptbande		CO + 3 konj. =	

Tabelle 15 a: Übersicht der IR-Absorptionen

Banden-Zuordnung	Subst. 1-4	Subst. 6	Subst. 7	Subst. 8	Piperin	Piperettin	Pierylin	Piperanin
-NH-Valenz	3300 s	3300 s	3300 s	3300 s	-	-	-	-
Amide offenkettig	3050 w	3080 w	3070 w	3070 w	-	-	-	-
- OH =	3030 w	3030 w	3030 w	3030 w	3030 w	3030 w	3030 w	3040 w
-CH<	2960 s	2970 s	2950 s	2950 s	2940 s	2940 m	2975 m	2940 w
-CH ₂ Valenzen	2925 s	2880 s	2920 s	2920 s	2860 m	2880 m	2955 m	2860 s
-CH ₃	2850 s	2840 s	2860 s	2860 s	2860 m	2840 m	2870 m	2860 s
							2865 m	
							2790 v	
Amid	1650 s	1650 s	1650 s	1650 s	-	-	-	1640 s
Aromatische Doppelbin-								
dungen oder Olefin +								
>C = C< oder Olefin +	1620 s	1620 s	1620 s	1620 s	1625 s	1625 s	1625 s	1625 s
Aryl (= Styrol) konjug.								
Olefin + >O oder								
Olefin + >C = O<	1600 s	1600 s	1600 s	1600 s	1600 s	nur ange-	1600 s	1600 s
weitere Konjugation zum						deutet		
Aryl (-Styrol + n Ole-								
fin)	-	-	-	-	1575 s	1575 s	1580 s	-
(n = 1 oder mehr)								
wahrscheinlich para- und								
unsymmetrische Tri-Sub-								
stitution								
offenkettiges Amid	1540 s	1540 s	1540 s	1540 s	1550 w	1560 s	-	-
1.2.4.-trisubstituiertes								
Aryl	-	1490 s	1490 s	1490 s	1500 m	1490 m	1490 m	1510 s
1.2.4.-trisubstituiertes								
Aryl	-	1480 s	1480 s	1480 s	1480 s	1480 s	1475 s	1480 s
CH ₂ -assym.Deformations-	1460 s	1460 m	1455 m	1455 m	1455 s	1455 s	-	1450 s
schwing. oder CH ₂ -Seiten-								
kette Def.	-	-	-	-	1435 s	1435 s	-	-
? -CH ₂ - CH = CH -	-	1430 s	1430 m	1430 s	1425 s	1425 s	1430 s	1430 s
? -CH ₂ - CH = CH -	-	-	-	-	-	-	1400 s	1380 w
symm. CH ₂ -Schwing.	1380 w	1380 w	1380 w	1380 w	-	-	1380 s	-
aufgespaltene Isopropyl-	1360 w-m	1360 m	1360 m	1360 m	-	-	1355 m	1340 m
bande	1325 w-m	1325 m	1330 m	1330 m	1350 m	1350 s	1325 w	-
- CH ₂ CH -	-	1300 w	1305 v	1305 v	1310 w	1295 w	1300 w	-
- CH = CH - rocking	-	-	-	-	1265 m	-	1270 w	1260 s
? -CH ₂ - CH = CH -	-	-	-	-	-	-	-	-
Isopropyl- oder Methylen-	1250 s	1250 s	1250 s	1250 s	1242 s	1250 s	1240 s	1245 s
cloxy-Gruppe								

Tabelle 15 b: Übersicht der IR-Absorptionen

Banden-Zuordnung	Subst. 1-4	Subst. 6	Subst. 7	Subst. 8	Piperin	Piperettin	Piperyllin	Piperanin
1.2.4.-Substitution, 1175-1225 cm ⁻¹	-	-	-	-	1220 s 1190 s	1230 s 1210 s 1175 w	1220 m 1185 s 1160 w	1210 s 1180 s
Isopropylschw.?	1180 w 1150 m	1180 m 1155 m	1180 m 1150 m	1180 m 1150 m	-	-	-	-
1.2.4.-Substitution -1 1090 - 1125 cm	-	-	-	-	1145 w	1145 w	1140 m	-
Methylenedioxygruppe	-	1120 w 1090 m	1115 w 1085 w	1115 w 1085 w	1130 s 1110 m	1120 m 1110 m 1085 m	1110 m 1195 m	1130 m 1115 m 1090 m
(-CH ± CH-)₂	-	1030 s	1035 s	1128 s	1025 s 1010 s	1030 s	1030 s	1030 s
- CH=CH - Aryl trifft schwach auch bei 1.2.4.-Substitution auf	992 s	990 s	995 s	980 s	990 s	1010 s	988 s	-
?	960 s	958 s	950 s	945 s	950 w	965 w	962 w	960 m?
Methylenedioxygruppe	-	-	-	-	940 w	942 w	934 m	-
Isopropylgruppe	870 w	915 s 868 s	910 s	905 s	925 s	920 s	928 s	920 s
arom. D-H 1 oder 2 freie Wasser- stoffatome	-	858 s 810 s	860 m 805 m	850 m 805 w	-	885 w 860 s 832 w 805 m	868 w 838 s 820 s	848 m 800 s
Isopropylgerüst- schw.?	800 m	790 s	788 m-s	785 m-s	-	-	-	-
wahrscheinlich 1.2.4.-Subst.	-	-	-	-	782 m	780 w	782 s	790 m
(CH₂)₄-rocking	717 s	717- 720 w	717 m	710 w-m	715 w 695 w	715 w 700 w	717 m 695 m	-
- CH ≡ CH - ?	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 16: H-NMR der Substanzen 1-4 und 17

H-NMR, 60 MHz, Angaben in δ -Werten

	Substanz 1 - 4	Substanz 17
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$ CH_3 Anfang der Kette	0.85 (9H,d,J = 6 Hz)	0.91 (9H,d,J = 6.5 Hz)
$-(\text{CH}_2)_n-$	1.18 (24H, breites s)	1.28 (~20H, breites s)
$-\text{CH} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$ $-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{CH}-$	1.8-2.2 (3H,m)	1.76-2.32 (7H,breites m)
$-\text{NH} - \text{CH}_2-$	3.08 (2H,t, J = 6 Hz)	3.17 (2H, t, J = 6 Hz)
isolierte Doppelbindung	-	5.38 (2H,t,J~5Hz)
α	5.67 (1H,d,J=15Hz)	5.78 (1H,d,J=15Hz)
Vinyl-Protonen	6.88-7.32 (1H,m $\rightarrow$ q)	7.02-7.43 (1H,m $\rightarrow$ q)
β	$J_{\beta\alpha} = 15 \text{ Hz}, J_{\beta\gamma} = 10 \text{ Hz}$	$J_{\beta\alpha} = 15 \text{ Hz}, J_{\beta\gamma} = 10 \text{ Hz}$
$-\text{NH}- + \gamma + \delta$	5.80-6.12 (3H,m)	5.92-6.19 (3H,m)

Tabelle 17: H-NMR der Scharfstoffe
H-NMR, 60 MHz, Angaben in δ -Werten

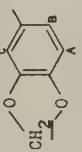
	Piperin	Piperettin	Piperylin
CH ₃	-	-	-
$ \begin{array}{c} \text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-} \\ \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{CH}_2 \diagdown \\ \quad \\ \text{CH}_2\text{-OH} \quad \text{CH}_2 \end{array} \end{array} $	1.62 (6H, breites s)	1.62 (6H, breites s)	-
$ \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{CH}_2 \diagdown \\ \quad \\ \text{CH}_2\text{-OH} \quad \text{CH}_2 \end{array} $	-	-	1.94 (4H, m)
$ \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{CH}_2 \diagdown \\ \quad \\ \text{CH}_2\text{-OH} \quad \text{CH}_2 \end{array} $	3.57 (4 H, breites s)	3.57 (4H, m)	3.57 (4H, t, J=6.5Hz)
	5.94 (2H, s)	5.96 (2H, s)	5.96 (2H, s)
Arom. und Vinyl-	α	6.38 (1H, d, J _{αβ} = 14 Hz)	6.25 (1H, d, J _{αβ} = 14 Hz)
	β	7.18-7.59 (1H, m, J _{αβ} = 14 Hz, J _{βγ} = 10.5 Hz)	7.19-7.60 (1H, m, J _{αβ} = 14 Hz, J _{βγ} = 10.5 Hz)
Protonen	γ, δ	6.51-7.00 (2H, m, J _{γδ} = 10.5 Hz, J _{γδ} = 10.5 Hz)	
	H _C		
	H _A H _B	6.64-7.00 (3H, m)	6.58-6.99 (5H, m)

Tabelle 18: H-NMR der Substanzen 6, 7 und 8 (Piperaesthine)

H-NMR, 100 MHz, Angaben in δ -Werten

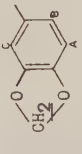
	Substanz 6	Substanz 7	Substanz 8
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	0.93 (6H, d, J=6Hz)	0.93 (6H, d, J=6Hz)	0.93 (6H, J=6Hz)
$-(\text{CH}_2)_n-$	-	1.36 (8H, breites s)	1.47 (4H, breites s), das sich in ein Multi- plett von 1.36-1.58 auf- zuspalten beginnt.
$-\text{CH} <$	1.81-2.03 (1H, m) bei Andeutung eines q, J=6Hz	1.75-1.94 (1H, m) bei Andeutung eines q, J=6Hz	1.75-1.94 (1H, m) bei Andeutung eines q, J=6Hz
$\begin{array}{c} \text{H}^2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} = \text{C} \begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ \text{H}^2 \end{array} \end{array}$	2.31 (4H, m) bei Andeutung eines t J=3Hz (1,3 Kopplung)	2.17 (4H, m) bei Andeutung eines d, J=6Hz	2.18 (4H, m) bei Andeutung eines d, J=6Hz
$-\text{NH}-\text{CH}_2-$	3.19 (2H, t, J=6Hz)	3.17 (2H, 6, J=6Hz)	3.17 (2H, t, J=6Hz)
$-\text{NH}-$	~ 5.5 (1H, breites s) ← verschwindet bei Deuterium-Austausch, das Triplet bei 3.19 wird zum Dublett (3.17) →	5.51 (1H, breites s)	5.58 (1H, breites s)
	5.94 (2H, s)	5.93 (2H, s)	5.93 (2H, s)
Aromatische und vinylicche Protonen	5.78 (1H, d, J=15Hz)	5.76 (1H, d, J=15Hz)	5.76 (1H, d, J=15Hz)
α	7.08-7.34 (1H, m, bei Andeutung eines q, J $\beta\alpha$ = 15 Hz, J $\beta\gamma$ = 10Hz)	7.08-7.32 (1H, m, bei Andeutung eines q, J $\beta\alpha$ = 15Hz, J $\beta\gamma$ = 9Hz)	7.07-7.32 (1H, m, bei Andeutung eines q, J $\beta\alpha$ = 15Hz, J $\beta\gamma$ = 10Hz)
β	5.90-6.43 (4H, m)	5.88-6.39 (4H, m)	5.88-6.39 (4H, m)
$\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$			
A B C	6.75 (2H, s) u. 6.88 (1H, s)	6.74 (2H, s) u. 6.9 (1H, s)	6.74 (2H, s) u. 6.88 (1H, s)

Tabelle 19:

^{13}C -NMR von Piperin (DMSO, 25.2 MHz, TMS)

Intensität	ppm	C-Zuordnung
32	164.3	C=O
43	147.7	3,4
53	147.4	
151	140.9	β
113	137.0	γ
45	130.7	1
165	125.5	α
115	121.7	6
97	120.8	6
145	108.0	5
152	105.4	2
154	100.8	CH_2 - dioxy
110	44.0	2',6'
206	25.5	5',3'
132	23.8	4'

Aromatische C: 1 - 6

Piperidin C: 2' - 6'

Vinylische C: $\alpha, \beta, \gamma, \delta$

Tabelle 20:

^{13}C -NMR von Substanz 20 (DMSO, 25,2 MHz, TMS)

Intensität	ppm	C-Zuordnung
19	164.2	C=O
38	147.7	3,4
22	147.4	
45	147.3	
16	141.0	β
66	137.0	γ
52	136.5	1
84	136.3	
130	134.2	
29	130.8	
31	130.3	
16	130.2	
143	126.7	
17	125.5	
53	123.7	
128	123.6	
129	122.9	α
16	121.8	
76	121.4	
17	120.9	
15	120.8	
57	120.3	
121	108.5	
72	108.0	
119	107.9	
29	107.7	
67	105.4	6
25	105.3	
16	105.0	
193	100.9	
25	100.5	
23	55.9	
22	44.4	
79	44.0	
22	43.7	
19	40.5	
18	38.8	5
282	25.5	
219	23.8	
23	19.7	
18	18.1	

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) H. GLATZEL, Die Gewürze. Ihre Wirkungen auf den gesunden und kranken Menschen, Nicolaische Verlagsbuchhandlung, Herford (1968)
- 2) HAGERS Handbuch, Bd. 6, 702, Springer Verlag, Heidelberg (1977)
- 3) HOPPE, Drogenkunde, 7. Auflage, Cram, de Gruyter & Co, Hamburg (1958)
- 4) WATT and Breyer-Brandswijk, Medicinal und Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa (1962)
- 5) M.C. SRIVASTAVA, S.W. Singh, J.P. Tiwari, Indian J. Pharm. 30, 65 (1968)
- 6) K. MÜNZING-VASIRIAN, Dissertation, München (1974)
- 7) F. BERGER, Handbuch der Drogenkunde Bd. 3, Maudrich Verlag, Wien (1952)
- 8) BROCKHAUS, Lexikon, Wiesbaden (1972)
- 9) L. REINHARDT, Kulturgeschichte der Nutzpflanzen, Bd. 4/1, 521-533, Verlag Ernst Reinhardt, München (1911)
- 10) A. TSCHIRCH, Handbuch der Pharmakognosie, Verlag v.Chr. Herm. Tauchnitz, Leipzig (1923)
- 11) HAGERS Handbuch der pharmazeutischen Praxis 2.Ergb./2, Springer Verlag, Heidelberg 1958
- 12) STRASSBURGER, Lehrbuch der Botanik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1958
- 13) KARSTEN-WEBER-STAHN, Lehrbuch der Pharmakognosie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1962
- 14) G. GASSNER, Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Nahrungs- und Genußmittel, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1955
- 15) J. DEBRAUWERE, M. Verzele, Bull.Soc.Chim.Belg. 84/3, 167 (1975); J.Sci.Food Agric. 26/12, 1887-94 (1975); J. Chromat. Science 14, 296 (1976)
- 16) W.G. JENNINGS, R.E. Wrolstad, J.Food Sci. 26, 499 (1961) und 30, 274 (1965) Food Techn. 16, 107 (1962)
- 17) S.V. KAMENSHCHIKOVA, J.G. Mokhnachev, M.P. Kuz'min, CA 62, 8929e (1965)
- 18) Y.S. LEWIS, E.S. Nambudiri, N. Krishnamurthy, Perfum. Essent. Oil Rec. 69, 259 (1969)
- 19) C.J. MÜLLER, W.G. Jennings, J. Agric. Food Chemistry 15/5, 762 (1967)
- 20) C.J. MÜLLER, R.K. Creveling, dto. 16/1, 113 (1968)
- 21) R.M. PANGBORN, W.G. Jennings, C.F. Noeltling, Flavour Ind. 1/11, 763 (1970)
- 22) H.M. RICHARD, Ind. Aliment.Agr. 89/2, 147 (1972) C.A. 77, 32990d (1972)
- 23) H.M. RICHARD, W.J. Jennings, J. Food Sci. 36/4, 584 (1971)
- 24) H.M. RICHARD, G.F. Russell, W.G. Jennings, J.Chrom.Sci. 9/9, 560 (1971)
- 25) G.F. RUSSELL, W.G. Jennings, J. Agric.Food Chem. 17/5, 1107 (1969)

- 26) OERSTED, Schweiggers Journ. f. Chem.und Phys. 29, 80 (1819)
- 27) J.T. TRAXLER, J. Agr.Food Chem. 19/6, 1135 (1971)
- 28) F.S. SPRING, J. Stark, J. Chem. Soc. 1177 (1950)
- 29) R. GREWE, W. Freist, H. Neumann, S. Kersten, Chem.Ber. 103/12, 3752 (1970)
- 30) E. HALBERT, D. Weeden, Nature 212, 1603 (1966)
- 31) K.L. BEDI, C.K. Atal, K.T. Achaya, Lloydia 34, 256 (1971)
- 32) K.L. DHAR, C.K. Atal, Indian J.Chem. 5, 11 588 (1967)
- 33) M.L. RAINA, K.L. Dhar, C.K. Atal, Planta medica 30, 198 (1976)
- 34) J.I. OKOGUN, E.U. Ekong, J.Chem. Soc. 2195 (1974)
- 35) O.P. GUPTA, S.C. Gupta, K.L. Dhar, C.K. Atal, Indian J.Chem. 12, 912 (1976)
- 36) W. KARRER, Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart (1958)
- 37) A.F. KLUGE, C.P. Lillya, J. Org.Chem. 36, 1988 (1971)
- 38) R. DE CLEYN, M. Verzele, Chromatographia, 5, 345 (1972)
- 39) A.E. SCHWARTING, Vortrag, Arzneimitteltkongress München 1976
- 40) H. STOBBE, A. Hensel, W. Simon, Journal für praktische Chemie, 110, 129 (1925)
- 41) A. MUSTAFA, Chem. Rev. 51, 1 (1952)
- 42) H.P. KAUFMANN, A.K.S. Gupta, Ann.Chem. 681, 39 (1965)
- 43) R.T. LA-LONDE, C.B. Davis, Canad. J.Chem. 47, 3250 (1969)
- 44) M.D. COHEN, A. Elgavi, B.S. Green, Z. Ludmer, G.M.J. Schmidt, J. Amer. Chem. Soc. 94, 6776 (1972)
- 45) B. LABRUYERE, J. Agr. Food Chem. 14/5, 469 (1966)
- 46) O.P. GUPTA, K.L. Dhar, C.K. Atal, Phytochemistry 15/3, 425 (1976)
- 47) B.S. JOSHI, N. Viswanathan, D.H. Gawad, W.v. Philipsborn, Helv. Chim.Acta 58/6, 1551 (1975)
- 48) American Spice Trade Association "Official Analytical Methods", Method 12, p. 30 (1960)
- 49) E.L. WICK, und St.E. Cairncross, Food Technol. 10, 423 (1956)
- 50) H.J. FAGEN und Mitarb., J.Agric. Food Chem. 3, 860 (1955)
- 51) F. TAUSIG und Mitarb., Food Technol. 10, 151 (1956)
- 52) Ch. GENEST und Mitarb., J. Agric. Food Chem. 11, 508 (1963)
- 53) H.D. GRAHAM, J. Food Sci. 30, 644 (1965)
- 54) H.D. GRAHAM, J. Pharm. Sci. 54, 319 (1965)
- 55) H.D. GRAHAM, J. Food Sci. 30, 651 (1965)
- 56) M.L. SHANKARANARAYANA und Mitarb., Flavour Ind. 1, 173 (1970)
- 57) R.O.B. WIJSEKERA und Mitarb., Flavour Ind. 3, 133 (1972)
- 58) A. MÜLLER-STOCK und Mitarb., J. Chromatogr. (Amsterdam) 79, 229 (1973)
- 59) V. KUBELKA, Vortrag auf dem Second Joint Meeting of The American Society of Pharmacognosy and the Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Storrs, Conn. USA (1975)
- 60) D.W. CONNELL, und R. McLachlan, J. Chromatogr. (Amsterdam) 67, 29 (1972)
- 61) K.D. PARKER und Mitarb., Anal.Chem. 35, 356 (1963)
- 62) H. GLASL und H. Wagner, Dtsch.Apoth.-Ztg., 116, 45 (1976)

- 63) H. GLASL, I. Borup-Grochtmann und H. Wagner, Deutsche Apotheker-Zeitung 116/43, 1638 (1976)
- 64) Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. VI, S.524, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, (1970)
- 65) H.J. MEYER, H.U. May, Klinische Wochenschr. 42/8, 407 (1964)
- 66) R. HÄNSEL, Pacific Science 22, 293 (1968)
- 67) R. HÄNSEL, H.-U. Beiersdorff, Arzneimittelforschung 9, 581 (1959)
- 68) H.J. MEYER, Arch.int. Pharmacodyn. Nr. 2, 154 (1965)
- 69) H.J. MEYER, R. Kretzschmar, Arzneimittelforschung 19, 617 (1969)
- 70) R. KRETZSCHMAR, H.J. Meyer, Arch. int. Pharmacodyn. Nr.1, 175 (1968)
- 71) R. HÄNSEL, D. Weiß, B. Schmidt, Planta Medica 14 1, (1966)
- 72) O. RIBEIRO, A. Machado, C. Botafogo, Engenharia e quim. 4, 16 (1952), C.A. 46, 11585c (1952)
- 73) K. WIESNER, Canadian J. Chem. 29, 352 (1951)
- 74) R.W. DUNSTAN, H. Garnett, J. Chem.Soc. Transactions 67, 94 (1895)
- 75) R.W. DUNSTAN, H. Garnett, J. Chem.Soc. Transactions 67, 100 (1895)
- 76) J.W. LODER, A.Moorhouse, G.B. Russell, Austr.J.Chem. 22/7, 1531 (1969)
- 77) A. BANERJI, R. N. Rey, P.C. Ghosh, Experienta 3/30, 223 (1974)
- 78) O.P. GUPTA, C.K. Atal, K.N. Gaind, Phytochemistry 11/8, 2646 (1975)
- 79) C.K. ATAL, K.D. Dhar, J. Singh, Lloydia 38/3, 256 (1975)
- 80) E. STEINEGGER, R. Hänzel, Lehrbuch der Pharmakognosie, 3. Aufl. Springer Verlag Heidelberg - New York 1972
- 81) G. EHRHART, H. Ruschig, Arzneimittel 2/1, 113 (1972) Verlag Chemie Weinheim
- 82) N. LÖFGREN, Studies on Local Anesthetics, Verlag Ivar Haeggströme, Stockholm 13 (1948); ref. in 81)
- 83) J. BÜCHI, R.J. Koller, X. Perlia, Arzneim.-Forsch. 25, 14 (1975)
- 84) H. GILMAN, L.C. Heckert, R.McCracken, I.Am.Chem.Soc. 50, 437 (1928)
- 85) J. BÜCHI, X. Perlia, Arzneim.-Forsch. 10, 1 (1960)
- 86) K. KINDLER, Arch.Pharm. 266, 19 (1928)
- 87) E.J. ARIENS, Academic Press, New York Bd. 1 (1964)
- 88) J. BÜCHI, Grundlagen der Arzneimittelforschung und der synthetischen Arzneimittel, Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart 1963
- 89) M.E. FOURNEAU, J. de Pharmacie et de Chemie (7)2 56 (1910)
- 90) J. KLOSA, Entwicklung und Chemie der Heilmittel, Verlag Technik Berlin Bd. 1 (1952)
- 91) M. JACOBSON, J. Am.Chem.Soc. 77, 2461 (1955)
- 92) M. JACOBSON, J. Am.Chem.Soc. 78, 5084 (1956)
- 93) L. CROMBIE, J.Chem.Soc. 999 (1955)
- 94) F. ACREE, M. Jacobson, H.L. Haller, J.Org.Chem. 10, 236, 449 (1945) und 12, 731 (1947)

- 95) M. JACOBSON, J.Am.Chem. Soc. 76, 4606 (1954)
- 96) M. JACOBSON, Chem. and Ind. 50 (1957)
- 97) L. CROMBIE, J.Chem. Soc. 995 (1955)
- 98) L. CROMBIE, J. Taylor, J.Chem.Soc. 2760 (1957)
- 99) M. JACOBSON, J.Am.Chem.Soc. 73, 100 (1951)
- 100) M. JACOBSON, J.Am.Chem.Soc. 79, 356 (1957)
- 101) G.F.D'ALELIO, E.E. Reid, J.Am.Chem. Soc. 59, 109 (1937)
- 102) H. STAUDINGER, H. Schneider, Ber.Chem.Ges. 56, 699 (1923)
- 103) H. STAUDINGER, F. Müller, Ber.Chem.Ges. 56, 711 (1923)
- 104) J. SCHORMÜLLER, Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1961
- 105) E.F. HEEGER, Die Pharmazie 42 (1948)
- 106) Z. STARY, Naunym-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. 105, 76 (1925)
- 107) K. SANS, Dissertation, Heidelberg 1949
- 108) H. HENSEL, Allgemeine Sinnesphysiologie. Hautsinne, Geschmack, Geruch. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1966
- 109) R.F. SCHMIDT, Grundriß der Sinnenphysiologie, Springer-Verlag, Heidelberg (1977)
- 110) T. PECKOLT, Pharm. Rundschau Hamburg-New York 10, 279 (1892) und 11, 35 (1893); ref. in Hegnauer 2, 81 (1963)
- 111) O. GESSNER, Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, Carl Winter-Universitätsverlag, Heidelberg 1953
- 112) K. KAWAHATA, A. Ochiai, Y. Nukita, Folia pharmacol. Japon. 7, 11 (1928) ref. C.A. 23, 2499, 5236 (1929)
- 113) L. CROMBIE, J.Chem.Soc. 1007 (1955)
- 114) H.H. MEYER in Z. Stary, s. Lit. 106
- 115) J. BANERJI, K.P. Dhara, Phytochemistry 13, 2327 (1974)
- 116) Abrégé de matière médicale, Paris (1969)
- 117) E.K. HARVILL, A. Hartzell, J.M. Arthur, Contributions from Boyce Thompson Inst. 13, 87 (1943)
- 118) H.O. SCHROEDER, A.J. Howard, A.W. Linquist, J. of Economic Entomology 41/6, 890 (1948)
- 119) M.E. SYNERHOLM, A. Hartzell, J.M. Arthur, Contributions from Boyce Thompson Inst. 13, 433 (1945)
- 120) W.A. GERSDORFF, P.G. Piquett, J. of Economic Entomology 50/2, 164 (1957)
- 121) J.J. WILLAMAN, B.C. Schubert, Utilization Abstr. Economic Botany 9, 150 (1955)
- 122) A.J. SCOTT, Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press 1964.

L E B E N S L A U F

Geboren am 25.2.1937	in Berlin als Tochter des Diplom-Bergingenieurs Gerhard Grochtmann und seiner Ehefrau Mia, geb. Hahn
Seit August 1966	verheiratet mit dem Diplom-Kaufmann und Steuerberater Peter Borup; zwei Kinder, geb. 1970 und 1973
1943 - 1948	Volksschule in Friedrichsdorf in Westfalen
1948 - 1958	Gymnasium in Bielefeld und Köln
März 1958	Abitur an der Kaiserin-Augusta-Schule in Köln
ab SS 1958	Studium an der Universität München, und zwar zunächst Mineralogie, dann Lebensmittelchemie
November 1964	Staatsexamen in Lebensmittelchemie
Febr. 1965 - Aug. 1966	als Lebensmittelchemikerin bei der Firma Nestlé in Vevey/Schweiz
Sept. 1966 - Apr. 1968	als Chemikerin bei der Arzneimittel-firma Zyma-Blaes in München
Mai 1968 - Okt. 1973	als Chemikerin bei der Arzneimittel-firma Scherer GmbH in Eberbach/Baden
Mai 1974	Beginn der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmazeutische Arznei-mittellehre in München unter Leitung von Professor Dr. H. Wagner
Aug. 1974 - Juli 1976	Erhalt eines Stipendiums nach dem Graduiertenförderungsgesetz
Aug. 1974 - Juni 1977	als wissenschaftliche Hilfskraft am genannten Institut.

